

COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS COMO INHIBIDORES DE LAS CINASAS GCN2 Y PERK
REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 63/285,833, presentada el 3 de diciembre de 2021, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 63/348,557, presentada el 3 de junio de 2022, cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Las células cancerígenas necesitan un suministro continuo de nutrientes para mantener su crecimiento anormal y rápida división. Como parte de estos nutrientes, los aminoácidos son esenciales para soportar las altas demandas metabólicas de las células tumorales.

GCN2 es una serina/treonina proteína quinasa, una de las quinasas del factor de iniciación eucariota 2α (eIF2 α) que son los reguladores maestros en la respuesta integrada al estrés (ISR). La ISR es esencial para mantener la homeostasis celular bajo una amplia gama de factores estresantes y se activa cuando las células se adaptan a condiciones de tensión tal como hipoxia y privación de aminoácidos. La ISR se regula por fosforilación y activación de las eIF2 α quinasas, incluyendo GCN2, que actúan como respondedores tempranos a los disturbios en la homeostasis celular. Además de GCN2, hay otras tres familias de eIF2 α quinasas que incluyen la quinasa ER similar a PKR (PERK), la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR) y la eIF2 α quinasa regulada por el grupo hemo (HRI). Las cuatro eIF2 α quinasas comparten amplia homología en sus dominios catalíticos de quinasa pero poseen distintos dominios reguladores. Cada una de las IF2 α quinasas responde a distintas tensiones ambientales y fisiológicas, que reflejan sus mecanismos reguladores únicos. La PERK quinasa se activa bajo condiciones de tensión incluyendo el agotamiento de ATP y la respuesta de la proteína desplegada, y como GCN2, la activación de la PERK quinasa conduce a la regulación positiva del factor de transcripción de ISR clave ATF4.

Bajo condiciones de limitación de aminoácido esencial u otros factores estresantes (la irradiación de UV, estrés redox o inhibición del proteasoma), GCN2 fosforila eIF2 α , que inhibe la formación de un nuevo complejo ternario y por lo tanto la inhibición del inicio de la traducción del ARNm. Mientras disminuye la traducción global de ARNm, en las células tumorales la fosforilación de eIF2 α también incrementa la traducción del factor de transcripción de ISR ATF4, que incrementa la expresión de muchos genes de respuesta al estrés incluyendo genes dedicados a proporcionar aminoácidos a la célula tumoral: es decir, enzimas de síntesis de aminoácidos y transportadores que median el influjo de los aminoácidos en la célula tumoral. ATF4 se sobre-expresa en tumores líquidos

y sólidos humanos lo que sugiere una función importante en el progreso del tumor.

La asparagina es un aminoácido importante implicado en varias trayectorias biosintéticas que influyen significativamente en la carcinogénesis y la biología tumoral. Todas las células necesitan asparagina para su síntesis y crecimiento de proteínas. Las células normales obtendrán la mayor parte de sus requisitos de asparagina a través de la síntesis interna. En comparación con las células normales, las células cancerígenas requieren cantidades elevadas de asparagina para crecer y proliferar, no pueden producir esa cantidad requerida por sí mismas y deben depender de la asparagina circulante para sobrevivir. La asparagina sintetasa (ASNS) cataliza la síntesis de la asparagina a partir de aspartato y glutamina. La L-asparaginasa (ASNasa) elimina la asparagina circulante, privando de este modo a las células cancerígenas de un nutriente clave y provocando que mueran. El uso de L-asparaginasa, el primer ejemplo de tratamiento contra el cáncer dirigido a una característica metabólica específica del tumor, es un tratamiento bien establecido en leucemia linfoblástica aguda pediátrica (ALL), pero la toxicidad ha limitado su uso más allá de esta población de pacientes. La expresión de nivel particularmente bajo de ASNS en numerosas líneas celulares de ALL, en comparación con la de las células normales, hace al agotamiento de la asparagina un método efectivo de tratamiento debido a la inusual dependencia de las células de la asparagina sérica circulante como una nutrición necesaria para el crecimiento. Una respuesta pobre a la asparaginasa se relaciona con un riesgo incrementado de recaída. Otros tipos de cáncer hematológicos y sólidos expresan bajos niveles de ASNS y, por lo tanto, también deben ser auxótrofos de asparagina y sensibles a la asparaginasa. Por el contrario, en algunos tipos de cáncer ASNS se sobreexpresa, promoviendo la proliferación celular, quimiorresistencia y un comportamiento metastásico. En el caso de los tipos de cáncer resistentes a asparaginasa, el efecto de la depleción de asparagina en sangre a través de la L-asparaginasa en su lugar conduce a una sobreexpresión importante en ASNS para compensar, anulando efectivamente el efecto del fármaco para quimioterapia. Numerosos estudios han mostrado que ASNS está en el centro de la respuesta celular a la privación de aminoácidos y otras formas de estrés celular. A través de la regulación transcripcional, el gen ASNS es un objetivo de dos trayectorias de señalización destinadas a asegurar la supervivencia celular. La primera, denominada Respuesta a Aminoácidos (AAR), se activa por la GCN2 quinasa bajo condiciones de disponibilidad desequilibrada de aminoácidos. La segunda trayectoria, denominada la Respuesta de Proteína Desplegada (UPR), se activa por la PERK quinasa bajo condiciones de estrés incrementado del retículo endoplásmico. Las trayectorias de AAR y UPR convergen en la fosforilación de eIF2 α , que provocan la atenuación de la síntesis de proteína global y, al mismo tiempo, la traducción preferencial de una población seleccionada de un ARNm, incluyendo el factor de transcripción ATF4. ATF4 es el factor principal para la inducción de ASNS, trabajando como un activador trans a través de la unión de un elemento mejorador dentro del

promotor de ASNS.

GCN2 sintetiza las células cancerígenas con baja expresión de nivel basal de ASNS al agente antileucémico L-asparaginasa in vitro e in vivo. El tratamiento con inhibidores de GCN2 hizo que las células de la leucemia linfoblástica aguda fueran sensibles a la L-asparaginasa al prevenir la inducción de ASNS. Los inhibidores de GCN2 exhiben efectos antiproliferativos sinérgicos con L-asparaginasa en cánceres bajos en/deficientes de ASNS. Por lo tanto, el tratamiento combinado con los inhibidores de GCN2 y L-asparaginasa muestran compromiso para lograr resultados mejorados en leucemia linfoblástica aguda y otros tipos de cáncer. La leucemia linfoblástica aguda, la leucemia mieloide aguda y las células de cáncer de páncreas son particularmente sensibles al tratamiento combinado con L-asparaginasa e inhibidores de GCN2. Los estudios previamente reportados demostraron fuertes actividades antitumorales del tratamiento combinado con ASNasa e inhibidores de GCN2 en leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda y células de cáncer de páncreas en comparación con los resultados del tratamiento con un solo agente de L-asparaginasa o inhibidor de GCN2. De este modo, los inhibidores de GCN2 pueden representar agentes sensibilizantes a la L-asparaginasa que se utiliza para tratar estos tumores. En resumen, la inhibición de GCN2 mejora la sensibilidad al tratamiento con L-asparaginasa al prevenir la inducción de ASNS en células cancerígenas con baja expresión de ASNS a niveles basales.

La inhibición de GCN2 también puede ser una estrategia efectiva para dirigir el microentorno tumoral, incluyendo el sistema inmune, incluyendo inmunovigilancia dependiente de triptófano de células tumorales.

El microentorno tumoral [TME; una serie de componentes extracelulares y células estromales (células endoteliales, fibroblastos asociados al cáncer, macrófagos asociados al tumor, células T infiltrantes del tumor) que rodean las células tumorales] se caracteriza por deficiencias en el oxígeno y nutrientes clave, tal como glucosa y aminoácidos, dando como resultado en entorno inmunosupresor general.

Muchos tumores evolucionaron para escapar de la vigilancia inmunológica tomando ventaja de su flexibilidad metabólica y redirigiendo los nutrientes para su propia ventaja. Las células estromales y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) dentro del tumor crean un entorno pobre en nutrientes que inhibe la función inmune y soporta el crecimiento del tumor.

El catabolismo elevado del triptófano, uno de los aminoácidos esenciales, impulsado por la sobreexpresión de enzimas críticas en el metabolismo del triptófano [indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO)] es impulsado por células del microentorno tumoral, lo que lleva a un microentorno inmunosupresor en muchos tipos de cáncer. Se considera el agotamiento local del triptófano un mecanismo inmunosupresor crucial de las células T. En las células T, la GCN2 quinasa se ha identificado como un sensor molecular de la privación de triptófano.

La activación de GCN2 por medio del agotamiento de triptófano induce la apoptosis y mitiga la proliferación de célula T. GCN2 es un componente de señalización del efector clave para IDO/TDO y se considera un punto de control metabólico de células T altamente dependientes de triptófano.

La trayectoria de GCN2 no solo es importante para el escape inmune tumoral sino también juega un papel activo en la modulación de otros aspectos del microentorno tumoral. Se ha demostrado que el silenciamiento génico de GCN2 previene la expresión inducida por la privación de aminoácidos (AAD) del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) que los tumores utilizan para mejorar el suministro de nutrientes a través de una mayor vascularización. De este modo, la activación de la trayectoria de GCN2/ATF4 promueve el crecimiento del tumor y angiogénesis a través de la expresión de VEGF mediada por AAD. La anulación de la expresión de ATF4 o GCN2 inhibió significativamente el crecimiento tumoral in vivo.

Por lo tanto, la inhibición selectiva de GCN2 puede tanto incrementar la actividad del sistema inmune como disminuir la vascularización en el microentorno tumoral. La trayectoria de GCN2-eIF2 α -ATF4 es crítica para mantener la homeostasis metabólica en células tumorales bajo condiciones de estrés y para mantener un microentorno de células inmunes inmunosuprimidas. La trayectoria de PERK-ATF4 también es crítica para mantener la homeostasis en células tumorales bajo condiciones de estrés. Se ha informado que existe una regulación cruzada de las vías de señalización de GCN2 y PERK, de modo que la inhibición de GCN2 puede activar PERK como mecanismo compensatorio y viceversa, la inhibición de PERK activa GCN2 como mecanismo compensatorio.

Existe la necesidad de inhibidores de GCN2 y/o PERK que modulen los aspectos protumorales de GCN2 y/o PERK, tanto en la célula tumoral (célula tumoral autónoma) como en el microentorno de la célula inmunitaria tumoral.

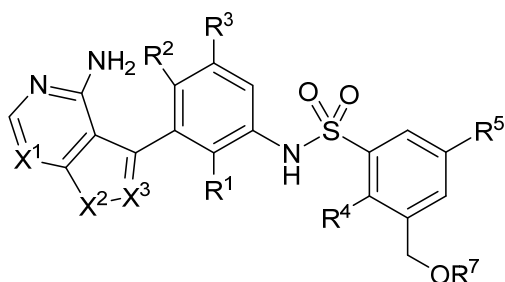
25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente se describen compuestos que modulan (por ejemplo, inhiben o activan) la GCN2 (control general no depresible 2) quinasa y/o PERK (quinasa ER similar a PKR) quinasa y métodos para usar los mismos para el tratamiento de trastornos, incluyendo enfermedades asociadas con GCN2 o PERK.

30

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto representado por la Fórmula I-A:



Fórmula I-A

o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, estereoisómero o tautómero del mismo, en donde: X¹ y X³ son cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en CH y N; X² se selecciona del grupo que consiste en NR⁶, O, y S; R¹, R², y R³ se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, ciano y alcoxi; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alcoxi y alquilo; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, halógeno y alquilo; R⁶ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquenal, alquino, alquinoalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcoxialquilo, cicloalqueno, heterociclilo, heterociclilalquilo, arilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; y R⁷ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo y acilo.

En otra modalidad, en la presente se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D descrito en la presente) y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para tratar una enfermedad provocada por una desregulación de una respuesta integrada al estrés en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar una enfermedad provocada por una desregulación de una respuesta integrada al estrés y/o una respuesta de proteína desplegada en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para modular la actividad de GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para activar la GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad

terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para modular la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para activar la PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para inhibir la GCN2 quinasa e inhibir la PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para modular la actividad de GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para inhibir la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para tratar una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK, en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para tratar una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes terapéuticos.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente

efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica descrita en la presente.

5 En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar un trastorno
seleccionado del grupo que consiste en melanoma, fibrosarcoma, cáncer de tiroides, cáncer de
ovario, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, tumores del
estroma gastrointestinal, tumores sólidos, cánceres transmitidos por la sangre, leucemia mielógena
aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y otros cánceres causados por la activación de la
trayectoria de señalización de GCN2 en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al
10 paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por
ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C e I-D descrito en el presente documento) o una
sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15

La figura 1 es una representación gráfica que demuestra la estimulación no esperada del marcador UPR/ISR ATF4 (barras de color negro) en respuesta a las concentraciones incrementadas del Compuesto 2.

20 La figura 2 muestra una gráfica de la estimulación de los oligómeros PERK inducidos por el Compuesto 2 en un ensayo NanoBRET.

La figura 3 muestra la estimulación de las proteínas de señalización corriente abajo de PERK ATF4 y CHOP (Actina como control de carga) en células de mieloma múltiple H929.

25 La figura 4 es una representación gráfica que demuestra la estimulación de los genes objetivo de ATF4 en respuesta a concentraciones crecientes del Compuesto 2 en células de mieloma múltiple H929.

La figura 5 ilustra los efectos del Compuesto 2 en lecturas de la trayectoria apoptótica en células de mieloma múltiple H929.

30 Las figuras 6A, 6B, 6C, y 6D representan los estudios de proliferación celular del Compuesto 2 en combinación con el tratamiento estándar en células de mieloma múltiple RPMI8226 (la figura 6A), células de mieloma múltiple H929 (la figura 6B), células de linfoma de Burkitt GA-10 (la figura 6C), y células de linfoma folicular (la figura 6D).

35 Las figuras 7A y 7B muestran los efectos del Compuesto 2 en combinación con asparaginasa en los niveles de ATF4, midiendo la actividad de GCN2, en un modelo PK/PD *in vivo*. La figura 7A muestra gráficas de datos de los resultados obtenidos de los estudios del modelo PK/PD y la figura 7B representa los resultados en forma tabular.

La figura 8 representa una gráfica que muestra el efecto del Compuesto 2 en combinación con asparaginasa sobre el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto MV-4-11.

La figura 9A muestra los efectos del Compuesto 2 en un ensayo de activación de GCN2 recombinante, midiendo la actividad de la enzima GCN2 recombinante *in vitro*.

5 La figura 9B ilustra los efectos del Compuesto 2 en un ensayo de activación de PERK recombinante, midiendo la actividad de la enzima PERK recombinante *in vitro*.

Las figuras 10A, 10B, y 10C muestran los efectos del Compuesto 2 en ISR y trayectorias de apoptosis en líneas celulares de cánceres de tumores sólidos (la figura 10A, H2030; la figura 10B, H358; la figura 10C, HT-1080).

10 Las figuras 11A, 11B, y 11C muestran los efectos del Compuesto 2 en un ensayo de proliferación de esferoides. La figura 11A ilustra la regresión celular en los esferoides de tumor sólido H2030 por el Compuesto 2 como agente único en los esferoides de tumor sólido H2030 como agente único. Las figuras 11B y 11C muestran los efectos del Compuesto 2 en proliferación celular de esferoides de tumor sólido H358 (la figura 11B) y HT-1080 (la figura 11C) como un solo agente.

15 Las figuras 12A, 12B, y 12C ilustran los efectos del Compuesto 2 en combinación con agentes estándar de atención para la inhibición del crecimiento de esferoides. La figura 12A representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H2030 tratados con el título del Compuesto 2 en combinación con o sin sotorasib. La figura 12B representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H2030 tratados con el título del Compuesto 2 en
20 combinación con o sin sotorasib. La figura 12C representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H2030 tratados con el título del Compuesto 2 en combinación con o sin trametinib.

Las figuras 13A, 13B, y 13C muestran los efectos del Compuesto 2 en el ensayo de silenciamiento génico de ARNhc HT-1080. La figura 13A ilustra el silenciamiento génico de GCN2 y
25 PERK mediante el uso de ARNhc dirigidos en la línea celular HT-1080. La figura 13B representa la cuantificación del Western blot de la señal ATF4. La figura 13C ilustra los efectos del Compuesto 2 en la inhibición del crecimiento de esferoides.

Las figuras 14A y 14B muestran los efectos del Compuesto 2 en el modelo PK/PD de xenoinjerto de fibrosarcoma HT-1080. La figura 14A muestra regulación al alza de los niveles de
30 ATF4 por el Compuesto 2 en diferentes dosis. La figura 14B muestra los niveles en plasma correspondientes del Compuesto 2 en varios puntos en el tiempo después de la dosis.

Las figuras 15A y 15B ilustran los efectos del Compuesto 2 en el **modelo** de eficacia del xenoinjerto HT-1080. La figura 15A muestra el efecto del Compuesto 2 en el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto colorrectal LoVo y la figura 15B muestra el efecto del Compuesto 2 en el
35 crecimiento tumoral del modelo de xenoinjerto de fibrosarcoma HT-1080.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las características y otros detalles de la descripción se describen de forma más particular a continuación. Ciertos términos utilizados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones anexas son recolectados aquí. Estas definiciones se deben leer tomando en consideración el resto de la descripción y la forma en que las entiende una persona con experiencia en la técnica. A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el mismo significado con que comúnmente los entiende una persona con conocimientos medios en la técnica.

Definiciones

Las definiciones establecidas en esta solicitud pretenden aclarar los términos utilizados a lo largo de esta solicitud.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica al que pertenece el tema de este documento. Como se utiliza en la especificación y reivindicaciones anexas, a menos que se especifique lo contrario, los términos siguientes tienen el significado indicado con el fin de facilitar la comprensión de la presente descripción.

Cuando se muestra que un enlace a un sustituyente cruza un enlace que conecta dos átomos en un anillo, entonces dicho sustituyente puede estar unido a cualquier átomo en el anillo. Cuando se enumera un sustituyente sin indicar el átomo a través del cual dicho sustituyente está unido al resto del compuesto de una fórmula dada, entonces dicho sustituyente puede estar unido a través de cualquier átomo en dicho sustituyente. Las combinaciones de sustituyentes, las posiciones de sustituyentes y/o variables son admisibles si dichas combinaciones resultan en compuestos estables.

Como se usa en la presente, las formas en singular "un", "una" y "el/la" abarcan las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Como se utiliza en la presente, el término "en la presente" significa toda la solicitud.

Como se utiliza en la presente, "deuterado" significa que por lo menos un átomo de hidrógeno está reemplazado por deuterio. En cualquier muestra de un compuesto deuterado, algunas moléculas discretas del compuesto probablemente tendrán hidrógeno, en lugar de deuterio, en la posición especificada. Sin embargo, el porcentaje de moléculas del compuesto deuterado que tienen un deuterio en la posición especificada será mucho mayor de lo que ocurriría naturalmente. El deuterio en la posición deuterada está enriquecido.

Tal como se usa en la presente, los términos "opcional" u "opcionalmente" significan que el evento o circunstancia que se describe posteriormente puede ocurrir o no ocurrir, y que la descripción incluye casos en los que ocurre el evento o circunstancia así como casos en los que no. Por ejemplo, "alquilo opcionalmente sustituido" se refiere al alquilo que puede estar sustituido así como en donde el alquilo no está sustituido.

Se entiende que los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos descritos pueden ser seleccionados por un experto en la técnica para dar como resultado compuestos químicamente estables que pueden sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica, así como los métodos expuestos a continuación, a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. Si un sustituyente se sustituye a sí mismo con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar en el mismo carbono o en diferentes carbonos, siempre que resulte una estructura estable.

Como se utiliza en la presente, el término "opcionalmente sustituido" se refiere al reemplazo de uno a seis átomos de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado incluyendo, más no limitándose a: hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, halógeno, alquilo, arilo, cicloalquilo, heterocíclico, amino, aminoalquilo, ciano, haloalquilo, haloalcoxi, $-OC(=O)-CH_2$ -Oalquilo. Preferiblemente, "opcionalmente sustituido" se refiere al reemplazo de uno a cuatro átomos de hidrógeno en una estructura dada con los sustituyentes mencionados arriba. Más preferiblemente, uno a tres átomos de hidrógeno se reemplaza por los sustituyentes como se mencionó arriba. Se entiende que el sustituyente puede ser además sustituido.

Como se utiliza en la presente, el término "sustituido" se refiere a las porciones que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la cadena principal. Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, por ejemplo, que no experimentan espontáneamente una transformación tal como por reordenamiento, ciclación, eliminación, etc. Como se utiliza en la presente, se contempla que el término "sustituido" incluya todos los sustituyentes permisibles de compuestos orgánicos. En un aspecto amplio, los sustituyentes permitidos incluyen sustituyentes acíclicos y cíclicos, ramificados y no ramificados, carbocíclicos y heterocíclicos, aromáticos y no aromáticos de compuestos orgánicos. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más e iguales o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados. Para los propósitos de esta solicitud, los heteroátomos tales como nitrógeno pueden tener sustituyentes hidrógeno y/o cualesquier sustituyentes admisibles de compuestos orgánicos descritos en la presente que satisfagan las valencias de los heteroátomos.

Los sustituyentes pueden incluir cualquier sustituyente descrito en la presente, por

ejemplo, tales sustituyentes, si no se especifica lo contrario, pueden incluir, por ejemplo, un halógeno, un hidroxilo, un carbonilo (como un carboxilo, un alcoxicarbonilo, un formilo o un acilo), un alcoxi, un amino, un amido, una imina, un ciano, un sulfonilo, un heterociclico, un aralkilo, un heteroaralkilo o una porción aromática o heteroaromática. Los expertos en la técnica entenderán que los sustituyentes se pueden sustituir por sí mismos, si es apropiado. Por ejemplo, los sustituyentes de un alquilo sustituido pueden incluir formas sustituidas o no sustituidas de amino, amido, sulfonilo y así como éteres, carbonilos (incluyendo carboxilatos, y ésteres), $-\text{CF}_3$, $-\text{CN}$ y similares. A menos que se establezca específicamente como "no sustituidas", las referencias a las porciones químicas en la presente se entienden que incluyen variantes sustituidas. Por ejemplo, la referencia a un grupo o porción "arilo" incluye implícitamente variantes tanto sustituidas como no sustituidas.

Como se utiliza en la presente, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo no aromático de cadena recta o ramificada que se satura por completo. Normalmente, un grupo alquilo de cadena recta o ramificada tiene de 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a aproximadamente 10, por ejemplo, puede ser alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ o por ejemplo, alquilo de $\text{C}_1\text{-C}_6$ a menos que se defina de otra forma. Ejemplos de los grupos alquilo de cadena recta o ramificado incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, 1-propil (n-propilo), 2-propilo, n-butilo, sec-butilo, tercbutilo, 1-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, neo-pentilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 1-heptilo, 2-heptilo, 3-heptilo, 4-heptilo, 1-octilo, 2-octilo, 3-octilo o 4-octilo y similares. Además, el término "alquilo", utilizado a la largo de la especificación, ejemplos y reivindicaciones pretende incluir tanto "alquilos no sustituidos" como "alquilos sustituidos", el último de los cuales se refiere a porciones alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura hidrocarbonada. El grupo "alquilo" puede estar opcionalmente sustituido.

El término " $\text{C}_x\text{-C}_y$ " cuando se utiliza en conjunto con una porción química, tal como acilo, aciloxi, alquilo, alquenoilo, alquinoilo o alcoxi, pretende incluir grupos que contienen de x a y carbonos en la cadena. Por ejemplo, el término " $\text{C}_x\text{-C}_y$ " significa grupos hidrocarburos saturados sustituidos o no sustituidos, incluidos los grupos alquilo de cadena lineal y alquilo de cadena ramificada que contienen de x a y carbonos en la cadena, incluidos grupos haloalquilo como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc. Alquilo de C_0 indica un hidrógeno en donde el grupo está en una posición terminal, un enlace si es interno.

El término "alquenoilo" como se utiliza en la presente se refiere a un hidrocarburo insaturado recto o ramificado que tiene por lo menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alquenoilo ejemplares incluyen pero no se limitan a, un grupo recto o ramificado de 2-6 o 3-4 átomos de carbono, denominados en la presente como alquenoilo de $\text{C}_2\text{-C}_6$, y alquenoilo de $\text{C}_3\text{-C}_4$, respectivamente. Los grupos ejemplares de alquenoilo incluyen, pero no se limitan a, vinilo, alilo,

butenilo, pentenilo, etc.

El término "alquinilo" como se utiliza en la presente se refiere a un hidrocarburo insaturado recto o ramificado que tiene por lo menos un triple enlace carbono- carbono. Los grupos alquinilo ejemplares incluyen pero no se limitan a, grupos rectos o ramificados de 2-6 o 3-6 átomos de carbono, denominados en la presente como alquinilo de C_2-C_6 , y alquinilo de C_3-C_6 ,
 5 respectivamente. Los grupos ejemplares alquinilo incluyen, pero no se limitan a, etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, hexinilo, metilpropinilo, etc.

Como se usa en la presente, el término "alcoxi" se refiere un radical hidrocarburo (alquilo) alifático saturado recto o ramificado unido a un átomo de oxígeno que se une a una estructura central. Preferiblemente, los grupos alcoxi tienen uno a seis átomos de carbono, es decir
 10 pueden ser alcoxi de C_1-C_6 . Ejemplos de los grupos alcoxi incluyen pero no se limitan a, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi, terc-butoxi, pentoxi, 3-metil butoxi y similares.

Como se utiliza en la presente, el término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo (como se definió arriba) sustituido con un grupo alcoxi y puede estar representado por la fórmula general alquil-O-alquilo. Ejemplos de grupos alcoxialquilo incluyen, pero no están limitados a, metil-
 15 O-etileno-, etil-O-etileno-.

Como se utiliza en la presente, el término "haloalquilo" se refiere al grupo alquilo (como se definió arriba) que se sustituye con uno o más halógenos. Un radical monohaloalquilo, por ejemplo, puede tener un átomo de cloro, bromo, yodo o flúor. Los radicales dihalo y polihaloalquilo
 20 pueden tener dos o más átomos de halógeno iguales o diferentes. Los ejemplos del haloalquilo incluyen, pero no se limitan a, clorometilo, diclorometilo, triclorometilo, dicloroetilo, dicloropropilo, fluorometilo, difluorometilo, trifluorometilo, pentafluoroetilo, heptafluoropropilo, difluoroclorometilo, diclorofluorometilo, difluoroetilo, difluoropropilo y similares.

Como se utiliza en la presente, el término "haloalcoxi" se refiere a radicales en donde uno o más de los átomos de hidrógeno del grupo alcoxi están sustituidos con uno o más
 25 halógenos. Ejemplos representativos de grupos "haloalcoxi" incluyen, pero no se limitan a, difluorometoxi ($-OCHF_2$), trifluorometoxi ($-OCF_3$) o trifluoroetoxi ($-OCH_2CF_3$).

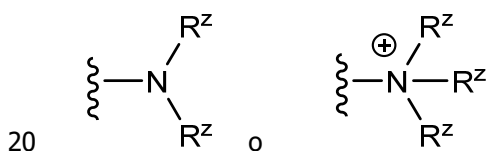
Como se utiliza en la presente, el término "arilo" incluye grupos aromáticos de un solo anillo sustituidos o no sustituidos en donde cada átomo del anillo es carbono. Preferiblemente,
 30 el anillo es un anillo de 5- a 7-miembros, más preferiblemente un anillo de 6 miembros. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos (anillos fusionados) en donde por lo menos uno de los anillos es aromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos. El término "fusionado" significa
 35 que el segundo anillo está unido o formado al tener dos átomos adyacentes en común con el primer

anillo. El término "fusionado" es equivalente al término "condensado". Ejemplos de grupos arilo incluyen pero no se limitan a fenilo, naftilo, fenantrilo, fenol, anilina, indanilo, dihidrobenzofuranilo, dihidroisobenzofuranilo, indolinilo, isoindolinilo y similares. A menos que se especifique lo contrario, los grupos arilo descritos en la presente pueden estar opcionalmente sustituidos.

5 Como se utiliza en la presente, los términos "policíclico", "policiclo" y "policíclico" se refieren a dos o más anillos (por ejemplo, cicloalquilos, cicloalquenos, cicloalquinos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos) en los que uno o más átomos son comunes a dos anillos contiguos, por ejemplo, los anillos son "anillos fusionados". Cada uno de los anillos del policiclo pueden estar sustituidos o no sustituidos. En ciertas modalidades, cada anillo del policiclo contiene de 3 a 10
10 átomos en el anillo, preferiblemente de 5 a 7.

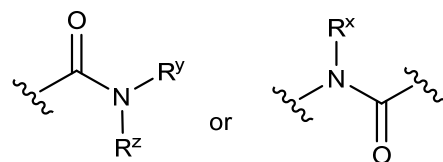
Como se utiliza en la presente, el término "acilo" se refiere a un grupo $-C(=O)-R^w$ en donde R^w es alquilo opcionalmente sustituido. Ejemplos del "acilo" incluyen, pero no se limitan a, casos en donde R^w es C_1-C_{10} alquil (C_1-C_{10} acilo) o C_1-C_6 alquil (C_1-C_6 acilo). En algunas modalidades, cada instancia del sustituyente opcionalmente sustituido se selecciona independientemente del grupo
15 que consiste en H, OH, alcoxi, ciano, F, y amino. Ejemplos adicionales de "acilo" incluyen $-C(=O)-CH_3$, $-C(=O)-CH_2-CH_3$, $-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_3$, o $-C(=O)-CH(CH_3)_2$.

Como se utiliza en la presente, los términos "amina" y "amino" se refieren tanto a aminas sustituidas como no sustituidas y sales de las mismas, por ejemplo, una porción que puede estar representada por:



en donde cada R^Z representa independientemente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo, o los grupos R^Z se toman junto con el átomo de N al cual están unidos para completar un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo.

25 Como se utiliza en la presente, los términos "amida" y "amido" se refieren a un grupo representado por



30 en donde R^X , R^Y , y R^Z cada uno representa de forma independiente hidrógeno o un grupo hidrocarbilo o R^Y y R^Z se toman junto con el átomo de N al que están unidos para completar un

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

Como se utiliza en la presente, el término "acilamino" se refiere a un grupo amino, como se definió arriba, sustituido con un grupo acilo.

5 Como se utiliza en la presente, el término "aminocarbonilo" se refiere a un grupo carbonilo sustituido con un grupo amino.

Como se utiliza en la presente, el término "alquenilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alqueno.

Como se utiliza en la presente, el término "alquinilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alquino.

10 Como se utiliza en la presente, el término "alquilamino" se refiere a un grupo amino, como se definió arriba, sustituido con por lo menos un grupo alquilo.

Como se utiliza en la presente, el término "aminoalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo amino.

15 Como se utiliza en la presente, el término "amidoalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo amido.

Como se utiliza en la presente, el término "cianoalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo ciano.

20 Como se utiliza en la presente, el término "cicloalcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo (como se definió arriba) sustituido con un grupo cicloalcoxi y puede estar representado por la fórmula general cicloalquil-O-alquilo. Ejemplos de los grupos cicloalcoxialquilo incluyen pero no se limitan a ciclopropil-O-metileno-, ciclopropil-O-etileno.

Como se utiliza en la presente, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo cicloalquilo.

25 Como se utiliza en la presente, el término "heteroarilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo heteroarilo.

Como se utiliza en la presente, el término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo heterociclilo.

Como se utiliza en la presente, el término "hidroxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo hidroxilo.

30 Como se utiliza en la presente, el término "cicloalquilo" solo o en combinación con otros términos se refiere a un hidrocarburo cíclico que está completamente saturado. "Cicloalquilo" incluye anillos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Normalmente, un grupo cicloalquilo monocíclico tiene de 3 a aproximadamente 10 átomos de carbono, más típicamente de 3 a 8 átomos de carbono (por ejemplo, cicloalquilo de C₃-C₁₀ o por ejemplo, cicloalquilo de C₃-C₆ a menos que se defina de otra forma. Los ejemplos de cicloalquilos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo,

35

ciclohexilo, cicloheptilo y similares. El segundo anillo de un cicloalquilo bicíclico o el segundo o tercer anillos de un cicloalquilo tricíclico, se pueden seleccionar de anillos saturados, no saturados y aromáticos. Cicloalquilo incluye moléculas bicíclicas y tricíclicas en donde uno, dos o tres o más átomos se comparten entre los dos anillos. Los cicloalquilos se pueden sustituir adicionalmente con alquilos, alquenos, alcoxis, aminoalquilos, alquilos sustituidos con carbonilo, -CF₃, -CN, y similares.

Como se utiliza en la presente, el término "cicloalquilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo cicloalquilo.

Como se utiliza en la presente, el término "ciano" se refiere a un grupo -CN.

Como se utiliza en la presente, el término "hidroxi" o "hidroxilo" se refiere a un grupo -OH.

Como se utiliza en la presente, el término "halo" o "halógeno" solo o en combinación con otros términos significa cloro, fluoro, bromo y yodo.

Como se utiliza en la presente, el término "heteroátomo" se refiere a un átomo de cualquier elemento diferente al carbono o hidrógeno. Ejemplos de heteroátomos son nitrógeno (N), oxígeno (O), azufre (S) y silicio (Si).

Como se utiliza en la presente, los términos "heterociclilo", "heterocicloalquilo", "heterociclo" y "heterocíclico" se refieren a un sistema de anillo no aromático, saturado o parcialmente saturado, incluido monocíclico, policíclico (por ejemplo, bicíclico, tricíclico) con puente o fusionado de 3 a 15 miembros que tienen por lo menos un heteroátomo o heterogrupos seleccionados de O, N, S, S(O), S(O)₂, NH o C(O) con los átomos restantes del anillo seleccionados independientemente del grupo que consiste en carbono, oxígeno, nitrógeno y azufre. Ejemplos de "heterocicloalquilo" incluyen pero no se limitan a azetidino, oxetano, imidazolidino, pirrolidino, oxazolidino, tiazolidino, pirazolidino, tetrahidrofuranilo, piperidino, piperazino, tetrahidropiranilo, morfolino, tiomorfolino, 1,4-dioxano, dioxidotiomorfolino, oxapiperazino, oxapiperidino, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidrotiofeno, dihidropiranilo, indolino, indolinimetilo, 2-azabicyclo[2.2.2]octano, azocino, cromano, xantenilo y N-óxidos de los mismos. La unión de un sustituyente heterocicloalquilo puede ocurrir a través de un átomo de carbono o un heteroátomo. Un grupo heterocicloalquilo se puede sustituir opcionalmente con uno o más grupos adecuados por uno o más grupos antes mencionados. Preferiblemente, "heterocicloalquilo" se refiere a un anillo de 5- a 6- miembros seleccionado del grupo que consiste en azetidino, oxetano, imidazolidino, pirrolidino, oxazolidino, tiazolidino, pirazolidino, tetrahidrofuranilo, piperidino, piperazino, tetrahidropiranilo, morfolino, tiomorfolino, 1,4-dioxano y N-óxidos de los mismos. Más preferiblemente, "heterocicloalquilo" incluye azetidino, pirrolidino, morfolino y piperidino. Heterocicloalquilo se sustituye opcionalmente con uno o más de los grupos antes mencionados.

Como se utiliza en la presente, el término "heteroarilo" se refiere a estructuras de

anillo único aromático sustituido o no sustituido, preferiblemente anillos de 5 a 7 miembros, más preferiblemente anillos de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen por lo menos un heteroátomo, preferiblemente uno a cuatro heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. El término "heteroarilo" también se refiere a sistemas de anillos aromáticos o

5 parcialmente aromáticos sustituidos o no sustituidos que contienen por lo menos un heteroátomo y que tienen dos o más anillos cíclicos (bicíclicos, tricíclicos o policíclicos), que contienen de 8 a 20 átomos en el anillo, adecuadamente de 5 a 10 átomos en el anillo, que pueden estar enlazados covalentemente o fusionados en los que dos o más átomos son comunes a dos anillos contiguos en los que por lo menos uno de los anillos es heteroaromático, por ejemplo, los otros anillos cíclicos

10 pueden ser cicloalquilos, cicloalquenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclos. Los anillos pueden contener un átomo de N o S, en donde el átomo de N o S se oxida opcionalmente o el átomo de N está opcionalmente cuaternizado. Todos los heteroarilos se sustituyen opcionalmente. Cualquier posición de anillo adecuada de la porción heteroarilo puede estar unida covalentemente a una estructura química definida. Ejemplos de heteroarilo incluyen, pero no se limitan a: furanilo,

15 tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, oxazolilo, cinnolinilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, 1H-tetrazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, piridilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo, benzoxazolilo, bencisoxazolilo, benzotiazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzotriazinilo, ftalazinilo, tiantreno, dibenzofuranilo, dibenzotienilo, bencimidazolilo, indolilo, isoindolilo, indazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, purinilo, pteridinilo, 9H-carbazolilo, alfa-carbolina,

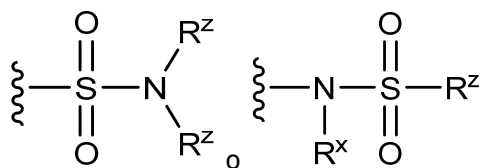
20 indolizínilo, benzoisotiazolilo, benzoxazolilo, pirrolopiridilo, furopiridinilo, purinilo, benzotiadiazolilo, benzoxadiazolilo, benzotriazolilo, benzotriadiazolilo, carbazolilo, dibenzotienilo, acridinilo y similares.

Como se utiliza en la presente, el término "hidrocarbilo" se refiere a un grupo que está unido a través de un átomo de carbono que no tiene un sustituyente =O o =S, y normalmente tiene por lo menos un enlace carbono-hidrógeno y una estructura principalmente de carbono, pero

25 puede incluir opcionalmente heteroátomos. De este modo, los grupos como metilo, etoxietilo, 2-piridilo, y trifluorometilo son considerados hidrocarbilo para los fines de esta solicitud, pero los sustituyentes como el acetilo (que tiene un sustituyente =O en el carbono de enlace) y el etoxi (que está unido a través de oxígeno, no de carbono) no lo son. Los grupos hidrocarbilo incluyen, pero no se limitan a, arilo, heteroarilo, cicloalquilo, heterocicilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, y combinaciones

30 de los mismos.

Como se utiliza en la presente, el término "sulfonamida" se representa por:



en donde cada R^Z , en cada instancia, representa independientemente un hidrógeno, alquilo o un grupo cicloalquilo, o los grupos R^Z tomados junto con el átomo de N al cual están unidos completan un heterociclo que tiene de 4 a 8 átomos en la estructura del anillo.

- 5 Como se utiliza en la presente, el término "sulfonilo" se refiere al grupo $\text{-S(O)}_2\text{-R}^{6d}$ en donde R^{6d} representa alquilo o cicloalquilo.

Una "terapia de combinación" es un tratamiento que incluye la administración de dos o más agentes terapéuticos, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I y la enzima asparaginasa (ASNasa) o un derivado de la misma, a un paciente que lo necesite.

- 10 "Enfermedad", "trastorno" y "condición" se utilizan indistintamente en la presente.

- "Individuo," "paciente," o "sujeto" se utiliza de manera intercambiable e incluye cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado, ovejas, caballos, o los primates, y más preferiblemente humanos. Los compuestos descritos en la presente se pueden administrar a un mamífero, tal como un humano, pero también se pueden administrar a otros mamíferos tales como un animal con necesidad de tratamiento veterinario, por ejemplo, animales domésticos (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayos, y similares).

- Los compuestos descritos en la presente son útiles para el tratamiento de enfermedades impulsadas por GCN2 (a veces abreviadas como "enfermedad relacionada con GCN2" en la presente especificación), por ejemplo, cáncer [por ejemplo, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer colorrectal familiar, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, tumor del estroma gastrointestinal), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno), mesotelioma, cáncer pancreático (por ejemplo, cáncer del conducto pancreático, tumor endocrino pancreático), cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso), cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ, cáncer de mama inflamatorio), cáncer de ovario (por ejemplo, carcinoma epitelial de ovario, tumor extragonadal de células germinales, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno), tumor de testículo, cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata dependiente de hormonas, cáncer de próstata no dependiente de hormonas, cáncer de

próstata resistente a la castración), cáncer de hígado (por ejemplo, hepatoma, cáncer de hígado primario, cáncer de las vías biliares extrahepáticas), cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma medular de tiroides), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células renales de células claras), carcinoma de células de transición de pelvis renal y uréter), cáncer de útero (por ejemplo, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, sarcoma de útero), coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral (por ejemplo, meduloblastoma, glioma, astrocitoma pineal, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, adenoma hipofisario), blastoma de retina, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células basales, melanoma maligno (melanoma)) , sarcoma (por ejemplo, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de células fusiformes, osteosarcoma), tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda (incluido crisis de leucemia crónica)), linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, enfermedad mieloproliferativa crónica), cáncer de núcleo primario desconocido], inhibidor del crecimiento del cáncer, inhibidor de metástasis de cáncer, promotor de la apoptosis y para la profilaxis o el tratamiento de lesiones precancerosas (por ejemplo, síndrome mielodisplásico de la médula ósea).

Los compuestos descritos en la presente, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I como se define en la presente, se pueden utilizar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar un trastorno descrito en la presente, tal como un cáncer descrito en la presente. En algunas modalidades, los compuestos que se describen en la presente se pueden utilizar en combinación con agentes terapéuticos hormonales, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunoterapéuticos, medicamentos que inhiben las acciones del factor de crecimiento celular y su receptor, tales como inhibidores de PERK e inhibidores de autofagia, la enzima asparaginasa (ASNasa), y similares.

"Farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" incluye entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica, u otra reacción inapropiada cuando se administra a un animal, o un humano, según sea apropiado. Para la administración humana, las preparaciones deben satisfacer la esterilidad, pirogenicidad y seguridad general y las normas de pureza según lo requerido por la Oficina de estándares biológicos de la FDA.

El término "portador farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" como se utiliza en la presente se refiere a cualquiera y a todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales media y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas

complementarias, adicionales o mejoradoras.

El término "composición farmacéutica" como se utiliza en la presente se refiere a una composición que comprende por lo menos un compuesto como se describe en la presente que se formula junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

5 El término "sal o sales farmacéuticamente aceptable(s)" tal como se utiliza en la presente se refiere a sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos utilizados en las composiciones. Los compuestos incluidos en las presentes composiciones que son de naturaleza básica tienen capacidad para formar una amplia variedad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos que se pueden utilizar para preparar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos básicos son aquellos que forman sales de adición ácida no tóxicas, es decir, sales que contienen aniones farmacológicamente aceptables, que incluyen, pero no se limitan a, sales malato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluensulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Los compuestos incluidos en las composiciones actuales que son ácidos en naturaleza son capaces de formar sales de base con varios cationes farmacológicamente aceptables. Ejemplos de dichas sales incluyen sales de metal alcalino o sales de metal alcalino térreo, y particularmente calcio magnesio, sodio, litio, zinc, potasio, y sales de hierro. Los compuestos incluidos en las composiciones actuales que incluyen una porción básica o ácida también pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con varios aminoácidos. Los compuestos de la descripción pueden contener grupos tanto ácidos como básicos; por ejemplo, un grupo amino y un ácido carboxílico. En tal caso, el compuesto puede existir como una sal de adición de ácido, un zwitterión o una sal básica.

25 Los compuestos de la descripción pueden contener uno más centros quirales y por lo tanto existir como estereoisómeros. El término "estereoisómeros", cuando se usa en la presente, consiste en todos los enantiómeros o diastereómeros. Estos compuestos pueden ser designados por el símbolo "*R*" o "*S*," dependiendo de la configuración de sustituyentes alrededor del átomo de carbono estereogénico pero los expertos en la técnica reconocerá que una estructura puede denotar un centro quiral de manera. Estos compuestos también pueden ser designados por "(+)" y "(-)" con base en sus propiedades ópticas de rotación. Los compuestos descritos en la presente abarcan varios estereoisómeros de estos compuestos y mezclas de los mismos. Las mezclas de los enantiómeros o diastereómeros se pueden designar por el símbolo "(±)" en la nomenclatura, pero el experto en la técnica reconocerá que una estructura puede denotar implícitamente un centro quiral.

35 En la presente especificación, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" se

refiere a la cantidad del compuesto en cuestión que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema o animal, (por ejemplo, un mamífero o un humano) que está siendo buscada por el investigador, veterinario, médico, u otro especialista. Los compuestos que se describen en la presente se administran en cantidades terapéuticamente efectivas para tratar un trastorno.

5 "Tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular, o eliminar, que tiene como resultado la mejora de la condición, enfermedad, trastorno, y similares.

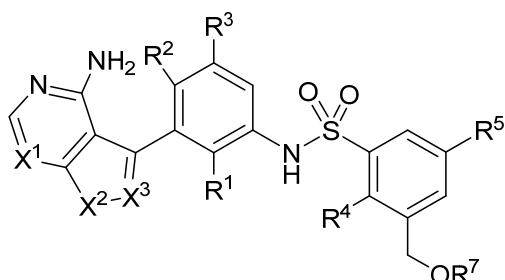
La descripción también abarca compuestos isotópicamente marcados que son idénticos a los mencionados en la presente, salvo que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o número de masa encontrado de forma más común en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos que se describen incluyen los isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , y ^{36}Cl , respectivamente. Por ejemplo, un compuesto de la descripción puede tener uno o más átomos de H reemplazados con deuterio.

15 Los enantiómeros y diastereómeros individuales de los compuestos descritos se pueden preparar sintéticamente a partir de materiales de partida comercialmente disponibles que contienen centros asimétricos o estereogénicos, o mediante la preparación de mezclas racémicas seguidas de métodos de resolución bien conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos de resolución se ejemplifican mediante (1) unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, separación de la mezcla resultante de diastereómeros por recristalización o cromatografía y liberación del producto ópticamente puro del auxiliar, (2) formación de sal empleando un agente de resolución ópticamente activo, o (3) separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas cromatográficas líquidas quirales o (4) resolución cinética utilizando reactivos químicos o enzimáticos estereoselectivos. Las mezclas racémicas también se pueden resolver en sus enantiómeros componentes mediante métodos bien conocidos, como la cromatografía líquida en fase quiral o la cristalización del compuesto en un solvente quiral. Las síntesis estereoselectivas, una reacción química o enzimática en donde un reactivo único forma una mezcla desigual de estereoisómeros durante la creación de un nuevo estereocentro o durante la transformación de uno preexistente, son bien conocidas en la técnica. Las síntesis estereoselectivas abarcan transformaciones enantio y diastereoselectivas y pueden implicar el uso de auxiliares quirales. Por ejemplo, véase Carreira and Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009.

Compuestos

35 En una modalidad, en la presente se describe un compuesto representado por la

Fórmula I-A:

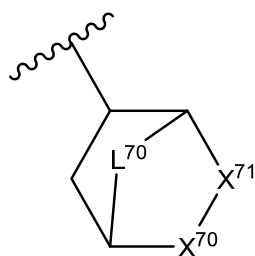


Fórmula I-A

- o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, estereoisómero o tautómero del mismo, en
 5 donde: X^1 y X^3 son cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en CH y N;
 X^2 se selecciona del grupo que consiste en NR^6 , O, y S; R^1 , R^2 , y R^3 se seleccionan cada uno
 independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, ciano y alcoxi; R^4 se selecciona del
 grupo que consiste en halógeno, alcoxi y alquilo; R^5 se selecciona del grupo que consiste en H,
 halógeno y alquilo; R^6 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquenilalquilo,
 10 alquinilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcoxialquilo, cicloalquenilo, heterociclilo,
 heterocicilalquilo, arilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; y R^7 se selecciona del grupo que consiste en
 H, alquilo y acilo.

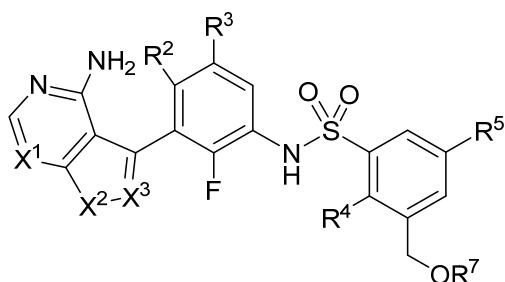
- En algunas modalidades, por lo menos uno de R^1 , R^2 , y R^3 es halógeno. En algunas
 modalidades, por lo menos uno de R^1 , R^2 , y R^3 es fluoro. En algunas modalidades, R^1 es fluoro. En
 15 algunas modalidades, X^1 es N.

En algunas modalidades, R^6 no es:



- en donde L^{70} es metileno o etileno, y uno de X^{70} y X^{71} es CH_2 , y el otro es $N-CO-R^{101}$, en donde R^{101}
 es alquilo de C_{1-4} ; alquenilo de C_{2-4} ; o alquinilo de C_{2-4} , cada uno de los cuales no está sustituido o
 20 está sustituido con uno a tres sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo
 que consiste en halógeno, ciano, hidroxilo, amino, $NH(C_{1-4}$ alquilo), $N(C_{1-4}$ alquilo) $_2$, cicloalquilo de C_{3-10} ,
 y heterocicloalquilo de C_{3-10} que contiene uno o dos heteroátomos, cada uno seleccionado
 independientemente del grupo que consiste en nitrógeno y oxígeno.

- En otra modalidad, en la presente se describe un compuesto representado por la
 25 Fórmula I-B:



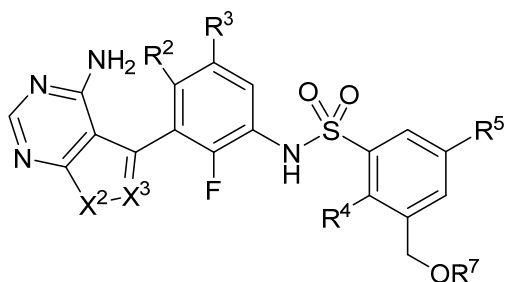
Fórmula I-B

- o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, estereoisómero o tautómero del mismo, en donde: X^1 y X^3 son cada uno independientemente seleccionado del grupo que consiste en CH y N;
- 5 X^2 se selecciona del grupo que consiste en NR^6 , O, y S; R^2 y R^3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, ciano y alcoxi; R^4 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alcoxi y alquilo; R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, halógeno y alquilo; R^6 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquenilalquilo, alquinilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcoxialquilo, cicloalqueno, heterociclilo,
- 10 heterociclilalquilo, arilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; y R^7 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo y acilo.

En algunas modalidades, X^1 es N.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto representado por la

Fórmula I-C:



15

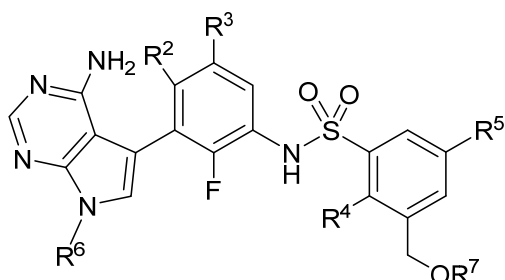
Fórmula I-C

- o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, estereoisómero o tautómero del mismo, en donde: X^2 se selecciona del grupo que consiste en NR^6 , O, y S; X^3 se selecciona del grupo que consiste en CH y N; R^2 y R^3 se seleccionan cada uno independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, ciano y alcoxi; R^4 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alcoxi y alquilo; R^5
- 20 se selecciona del grupo que consiste en H, halógeno y alquilo; R^6 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alqueno, alquenilalquilo, alquinilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcoxialquilo, cicloalqueno, heterociclilo, heterociclilalquilo, arilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; y R^7 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo y acilo.

25

En algunas modalidades, X^2 es NR^6 .

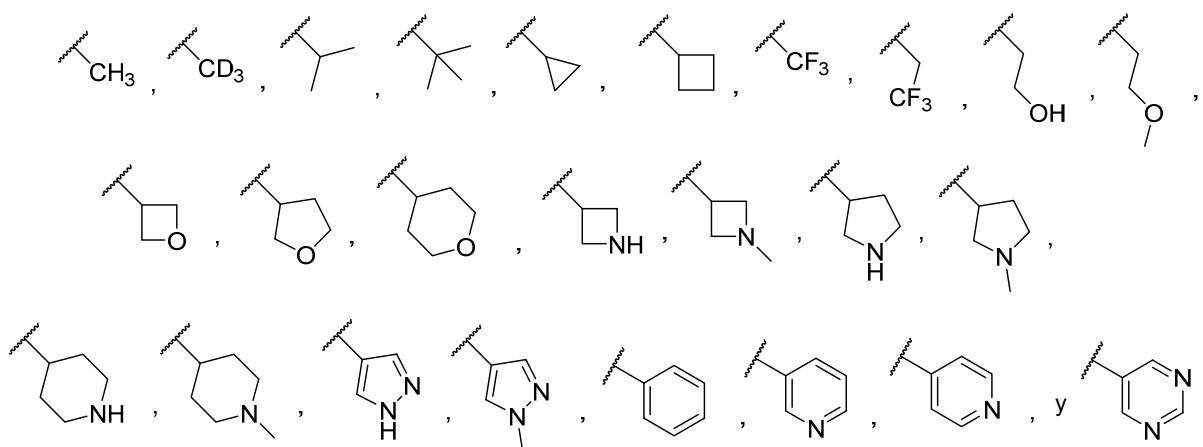
En otra modalidad, en la presente se describe un compuesto representado por la Fórmula I-D:



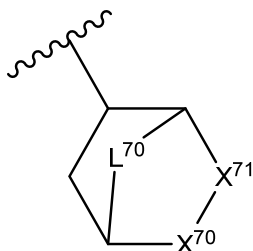
Fórmula I-D

- o una sal farmacéuticamente aceptable, enantiómero, estereoisómero o tautómero del mismo, en
 5 donde: R² y R³ cada uno se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, halógeno, ciano, y alcoxi; R⁴ se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alcoxi y alquilo; R⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, halógeno y alquilo; R⁶ se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo, alquenilo, alquenilalquilo, alquinilo, alquinilalquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, alcoxialquilo, cicloalquenilo, heterociclilo, heterocidilalquilo, arilo, heteroarilo y heteroarilalquilo; y R⁷
 10 se selecciona del grupo que consiste en H, alquilo y acetato.

- En algunas modalidades, R² es H y R³ es H. En algunas modalidades, R² es F y R³ es H. En algunas modalidades, R² es H y R³ es F. En algunas modalidades, R⁶ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de (C₁-C₈), alquenilo de (C₂-C₈), (C₂-C₈)alquenil-(C₁-C₄)alquilo, alquinilo de (C₂-C₈), (C₂-C₈)alquinil-(C₁-C₄)alquilo, cicloalquilo de (C₃-C₈), (C₃-C₈)cicloalquil-(C₁-C₄)alquilo, (C₃-
 15 C₈)alcoxi-(C₁-C₄)alquilo, cicloalquenilo de (C₃-C₈), (C₃-C₈)cicloalquenil-(C₁-C₄)alquilo, heterociclilo, heterocidil-(C₁-C₄)alquilo, arilo, heteroarilo, y heteroaril-(C₁-C₄)alquilo. En algunas modalidades, R⁶ se selecciona del grupo que consiste en alquilo de (C₁-C₈), cicloalquilo de (C₃-C₈), (C₃-C₈)alcoxi-(C₁-C₄)alquilo, heterociclilo, y heteroarilo. En algunas modalidades, R⁶ se selecciona del grupo que consiste en:



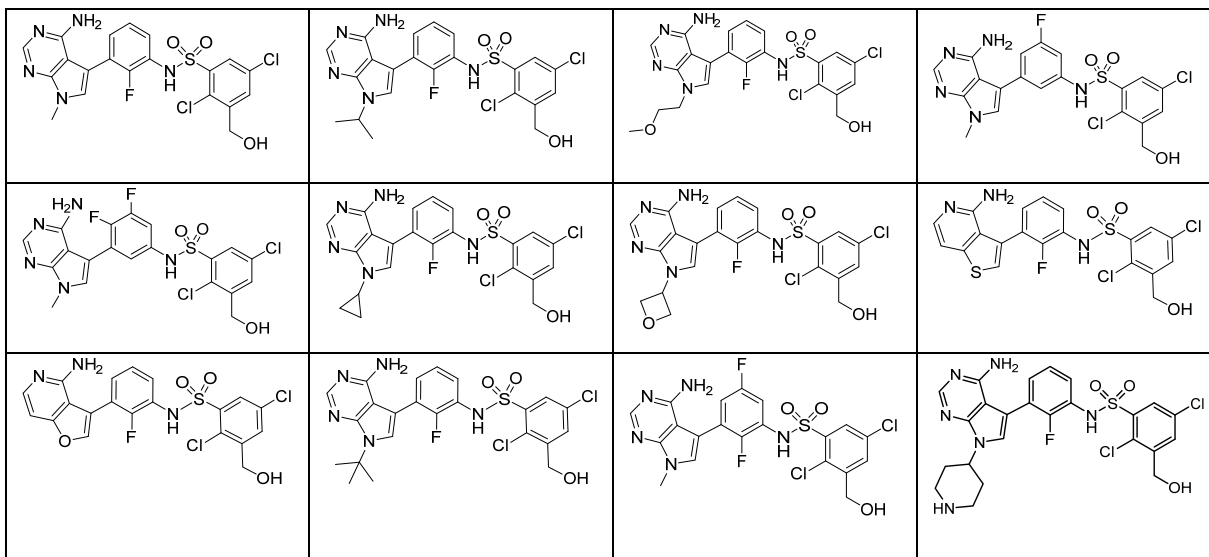
En algunas modalidades, R^6 no es:

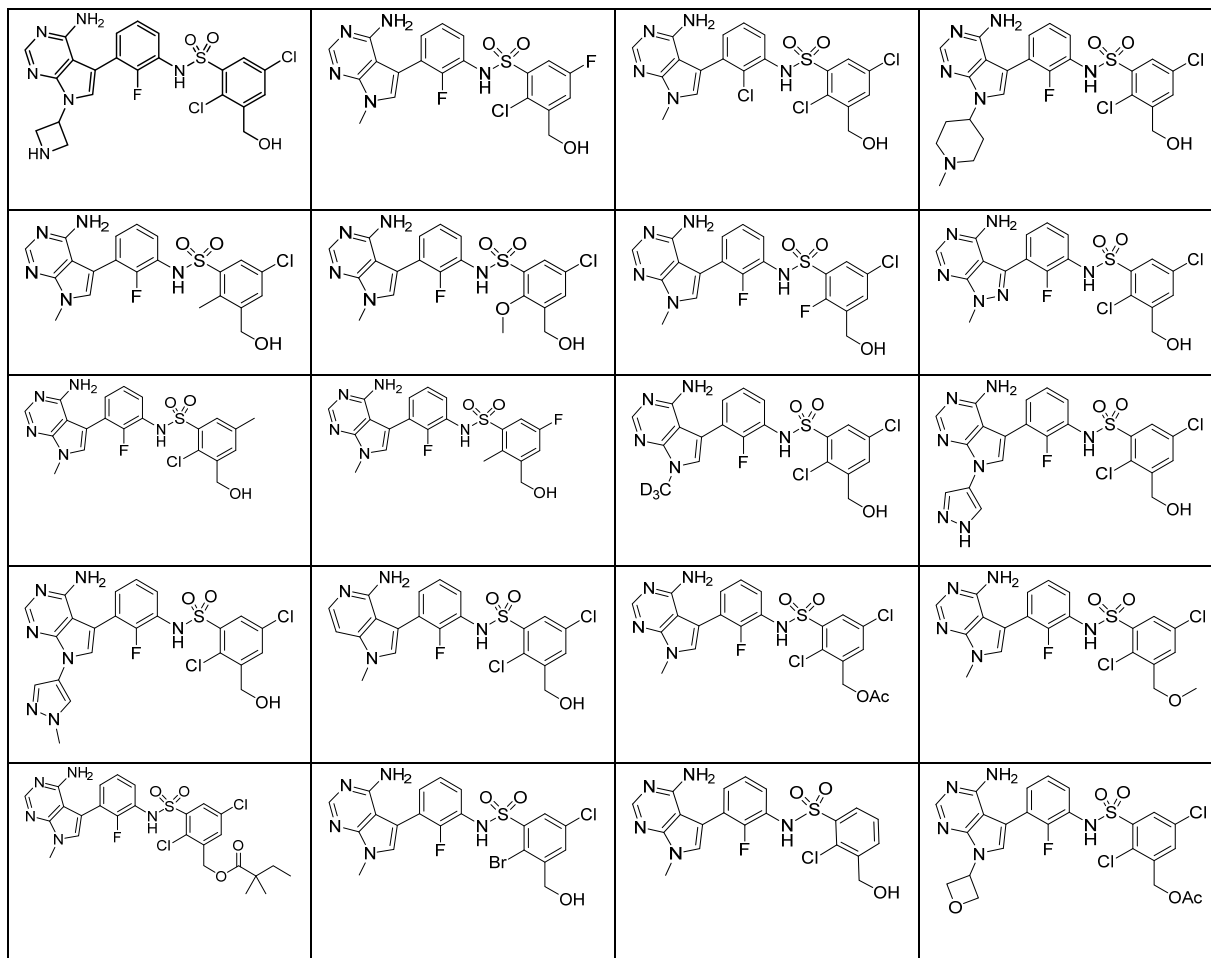


- 5 en donde L^{70} es metileno o etileno, y uno de X^{70} y X^{71} es CH_2 , y el otro es $N-CO-R^{101}$, en donde R^{101} es alquilo de C_{1-4} ; alquenilo de C_{2-4} ; o alquinilo de C_{2-4} , cada uno de los cuales no está sustituido o está sustituido con uno a tres sustituyentes, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en halógeno, ciano, hidroxilo, amino, $NH(C_{1-4}$ alquilo), $N(C_{1-4}$ alquilo) $_2$, cicloalquilo de C_3-10 , y heterocicloalquilo de C_3-10 que contiene uno o dos heteroátomos, cada uno seleccionado independientemente del grupo que consiste en nitrógeno y oxígeno.

- 10 En algunas modalidades, R^4 se selecciona del grupo que consiste en halógeno, alcoxi de (C_1-C_6) y alquilo de (C_1-C_6) . En algunas modalidades, R^4 se selecciona del grupo que consiste en cloro, fluoro, metoxi, y metilo. En algunas modalidades, R^5 se selecciona del grupo que consiste en H, halógeno y alquilo de (C_1-C_6) . En algunas modalidades, R^5 se selecciona del grupo que consiste en cloro, fluoro y metilo. En algunas modalidades, R^7 es H.

- 15 En una modalidad, en la presente se describe un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:





y sales, enantiómeros, estereoisómeros y tautómeros farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Métodos de tratamiento

Los compuestos descritos en la presente, por ejemplo, los compuestos de Fórmula I como se define en la presente, pueden actuar como agentes terapéuticos para enfermedades impulsadas por la GCN2 o PERK quinasa, y son útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos en pacientes que los necesitan, como el cáncer. Tipos de cáncer ejemplares incluyen pero no se limitan a, cáncer colorrectal, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer colorrectal familiar, cáncer colorrectal hereditario sin poliposis, tumor del estroma gastrointestinal, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, mesotelioma maligno), mesotelioma, cáncer de páncreas (por ejemplo, cáncer del conducto pancreático, tumor endocrino pancreático), cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico (por ejemplo, adenocarcinoma papilar, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma adenoescamoso), cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama (por ejemplo, carcinoma ductal invasivo, carcinoma ductal in situ, cáncer de mama inflamatorio), cáncer de ovario (por ejemplo, carcinoma epitelial de

ovario, tumor extragonadal de células germinales, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno), tumor de testículo, cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata dependiente de hormonas, cáncer de próstata no dependiente de hormonas, cáncer de próstata resistente a la castración), cáncer de hígado (por ejemplo, hepatoma, cáncer primario de hígado, cáncer de vías biliares extrahepáticas), cáncer de tiroides (por ejemplo, carcinoma medular de tiroides), cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células renales de células claras), carcinoma de células de transición de pelvis renal y uréter), cáncer de útero (por ejemplo, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, sarcoma de útero), coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral (por ejemplo, meduloblastoma, glioma, astrocitoma pineal, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico, adenoma hipofisario), retinoblastoma, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células basales, melanoma maligno, melanoma), sarcoma (por ejemplo, rabdomiosarcoma, leiomiosarcoma, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de células fusiformes, osteosarcoma), fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), incluida la crisis blástica de la leucemia crónica), linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, enfermedad mieloproliferativa crónica), cáncer de núcleo primario desconocido], inhibidor del crecimiento del cáncer, inhibidor de la metástasis del cáncer, promotor de apoptosis, y para la profilaxis o el tratamiento de lesiones precancerosas (por ejemplo, síndrome mielodisplásico de la médula ósea).

También se describe en la presente, en una modalidad, un método para tratar una enfermedad causada por una desregulación de una respuesta integrada al estrés en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica descrita en la presente. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por la GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por la PERK quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta de proteína desplegada es provocada por la PERK quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por la activación de una quinasa seleccionada del grupo que consiste en PERK quinasa y GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por activación de GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por activación de PERK quinasa.

También se describe en la presente, en una modalidad, un método para tratar una enfermedad causada por una desregulación de una respuesta integrada al estrés y/o una respuesta de proteína desplegada en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica descrita en la presente. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por la activación de una quinasa seleccionada del grupo que consiste en PERK quinasa y GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por activación de GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta de proteína desplegada es provocada por la activación de PERK quinasa.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para modular la actividad de GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para activar la GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para modular la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para activar la PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para inhibir la GCN2 quinasa e inhibir la PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para modular la actividad de GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una sal

farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, se describe en la presente un método para inhibir la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, o de una composición farmacéutica descrita en la presente.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar un cáncer en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T.

En una modalidad, en la presente se describe un método para tratar amiloidosis en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica

descrita en la presente. En una modalidad, en la presente se describe un método para tratar amiloidosis de cadena ligera en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una composición farmacéutica descrita en la presente.

5 En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK, en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente
10 aceptable del mismo o de una composición farmacéutica descrita en la presente. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con GCN2. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con PERK. En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de
15 mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y linfoma
20 maligno. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma,
25 cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En
30 algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T. En algunas modalidades, la
35 enfermedad es amiloidosis. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis de cadena ligera.

En otra modalidad, en la presente se describe un método para tratar una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK, en un paciente que lo necesita, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de las Fórmulas I-A, I-B, I-C, y I-D que se describen en la presente) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes terapéuticos. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con GCN2. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con PERK. En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, la leucemia es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis de cadena ligera. En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en L-asparaginasa, asparaginasa pegilada, un inhibidor de PERK, un inhibidor de mTOR, un agente inmunomodulador, un inhibidor de la trayectoria de MAPK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK y un inhibidor de Ras. En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos se selecciona del

grupo que consiste en un agente IMiD, un inhibidor del proteasoma, un esteroide, un agente anti-CD38, un agente anti-CD20, un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de PI3K, un anticuerpo Biespecífico, un análogo de nucleósido, un inhibidor de BTK, un agente alquilante de ADN, un inhibidor de EZH2, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa, un platino, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de exportación nuclear, un agente anti-microtúbulo, L-asparaginasa, asparaginasa pegilada, un inhibidor de PERK, un inhibidor de mTOR, un agente inmunomodulador, un inhibidor de la trayectoria MAPK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK y un inhibidor de Ras. En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en L-asparaginasa, pegaspargasa, calaspargasa pegol – mnkl, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, talidomida, pomalidomida, lenalidomida, dexametasona, prednisona, daratumumab, daratumumab / hialuronidasa, isatuximab, rituximab, obinutuzumab, venetoclax, idelalisib, copanlisib, duvelisib, umbralisib, gemcitabina, citarabina, ibrutinib, acalabrutinib, zanubrutinib, bendamustina, ciclofosfamida, tazemetostat, doxorubicina, daunorubicina etopósido, oxaloplatino, carboplatino, cisplatinbosutinib, dasatinib, imatinib, nilotinib, ponatinib, panobinostat, selinexor, vincristina, JZP-458, eriaspasa, PF745 (JZP-341), asparaginasa *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa), *Escherichia coli* asparaginasa (colaspasa), un agente anti-PD1, un agente anti-PDL1 y un agente anti-CTLA4.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de una enfermedad provocada por una desregulación de una respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada en un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por una quinasa seleccionada del grupo que consiste en PERK quinasa y GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por la GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés y/o la respuesta de proteína desplegada es provocada por la PERK quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta de proteína desplegada es provocada por la PERK quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por la activación de una quinasa seleccionada del grupo que consiste en PERK quinasa y GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por activación de GCN2 quinasa. En algunas modalidades, la desregulación de la respuesta integrada al estrés es provocada por la activación de PERK quinasa. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la modulación de la actividad de

GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la activación de la GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la modulación de la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la activación de PERK quinasa en un paciente que lo necesita.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la inhibición de GCN2 quinasa y la inhibición de PERK quinasa en un paciente que lo necesita. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la modulación de la actividad de GCN2 quinasa en un paciente que lo necesita. En otra modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en la inhibición de la actividad de PERK quinasa en un paciente que lo necesita.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de un cáncer en un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histiocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el

cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de amiloidosis en un paciente que lo necesita. En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de amiloidosis de cadena ligera en un paciente que lo necesita.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK, en un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con GCN2. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con PERK. En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histiocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis de cadena ligera.

En una modalidad, en la presente se describe un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica descrita en la presente, para usarse en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad relacionada con GCN2 y una enfermedad relacionada con PERK, en un paciente que lo necesita. En algunas modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con GCN2. En algunas

modalidades, la enfermedad es una enfermedad relacionada con PERK. En ciertas modalidades, la enfermedad es un cáncer. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, mesotelioma, cáncer de páncreas, cáncer de faringe, cáncer de laringe, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer duodenal, cáncer de intestino delgado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de testículo, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer uterino, coriocarcinoma gestacional, tumor cerebral, retinoblastoma, cáncer de piel, melanoma, sarcoma, fibrosarcoma, tumor óseo maligno, cáncer de vejiga urinaria, cáncer hematológico, leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de célula T, eritroleucemia, linfoma histiocítico, macroglobulinemia de Waldenstrom, y linfoma maligno. En algunas modalidades, el cáncer es leucemia. En algunas modalidades, la leucemia es leucemia mieloide aguda. En algunas modalidades, la leucemia es leucemia linfoblástica aguda. En algunas modalidades, el cáncer es fibrosarcoma. En algunas modalidades, el cáncer es mieloma múltiple. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de la célula B. En algunas modalidades, el cáncer es linfoma de célula T. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis. En algunas modalidades, la enfermedad es amiloidosis de cadena ligera. En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en un agente IMiD, un inhibidor del proteasoma, un esteroide, un agente anti-CD38, un agente anti-CD20, un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de PI3K, un anticuerpo Biespecífico, un análogo de nucleósido, un inhibidor de BTK, un agente alquilante de ADN, un inhibidor de EZH2, una antraciclina, un inhibidor de topoisomerasa, un platino, un inhibidor de tirosina quinasa, un inhibidor de HDAC, un inhibidor de exportación nuclear, un agente anti-microtúbulo, L-asparaginasa, asparaginasa pegilada, un inhibidor de PERK, un inhibidor de mTOR, un agente inmunomodulador, un inhibidor de la trayectoria MAPK, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK y un inhibidor de Ras. En algunas modalidades, uno o más agentes terapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en bortezomib, carfilzomib, ixazomib, talidomida, pomalidomida, lenalidomida, dexametasona, prednisona, daratumumab, daratumumab / hialuronidasa, isatuximab, rituximab, obinutuzumab, venetoclax, idelalisib, copanlisib, duvelisib, umbralisib, gemcitabina, citarabina, ibrutinib, acalabrutinib, zanubrutinib, bendamustina, ciclofosfamida, tazemetostat, doxorubicina, daunorubicina, etopósido, oxaloplatino, carboplatino, cisplatinbosutinib, dasatinib, imatinib, nilotinib, ponatinib, panobinostat, selinexor, vincristina, L-asparaginasa, pegaspargasa, calaspargasa pegol-mnkl, JZP-458, eriaspasa, PF745 (JZP-341), asparaginasa *Erwinia chrysanthemi* (crisantaspasa), *Escherichia coli* asparaginasa (colaspasa), anti-PD1, anti-PDL1, y anti-CTLA4..

Los compuestos proporcionados en la presente se pueden administrar a pacientes

(animales y humanos) en necesidad de dicho tratamiento en dosis que proporcionarán eficacia farmacéutica óptima. Se apreciará que la dosis necesaria para usarse en cualquier aplicación particular variará de paciente a paciente, no sólo con el compuesto o composición particulares seleccionados, sino también con la vía de administración, la naturaleza de la condición que se trata, la edad y la condición del paciente, la medicación simultánea o las dietas especiales seguidas en ese momento por el paciente, y otros factores que los expertos en la técnica reconocerán, con la dosis apropiada en última estancia siendo a discreción del médico auxiliar. Para tratar condiciones y enfermedades clínicas indicadas arriba, un compuesto proporcionado en la presente se puede administrar oralmente, subcutáneamente, tópicamente, parenteralmente, por aspersión inhalación o de forma rectal en formulaciones de dosis unitarias que contienen portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos, convencionales, adyuvantes y vehículos. La administración parenteral puede incluir inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas o intramusculares o técnicas de infusión.

El tratamiento se puede continuar durante un periodo tan largo o tan corto como se desee. Las composiciones pueden ser administradas en un régimen de, por ejemplo, una a cuatro o más veces al día. Un período de tratamiento adecuado puede ser, por ejemplo, por lo menos aproximadamente una semana, por lo menos aproximadamente dos semanas, por lo menos aproximadamente un mes, por lo menos aproximadamente seis meses, por lo menos aproximadamente 1 año, o indefinidamente. Un período de tratamiento puede terminar cuando se logra un resultado deseado.

20

Terapia de combinación

Los compuestos descritos en la presente, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I como se define en la presente, se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar un trastorno descrito en la presente, tal como un cáncer descrito en la presente. Por ejemplo, en la presente descripción se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente, por ejemplo, un compuesto de Fórmula I como se define en la presente, uno o más agentes terapéuticos adicionales y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula I como se define en la presente y un agente terapéutico adicional se administra. En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula I como se define en la presente y dos agentes terapéuticos adicionales se administran. En algunas modalidades, un compuesto de la Fórmula I como se define en la presente y tres agentes terapéuticos adicionales se administran. La terapia de combinación se puede lograr mediante la administración de dos o más agentes terapéuticos, cada uno de los cuales se formula y administra por separado. Por ejemplo, un compuesto de la Fórmula I como se define en la presente y un agente terapéutico adicional se pueden formular y administrar por separado. La terapia de

combinación también se puede lograr administrando dos o más agentes terapéuticos en una única formulación, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula I como un agente terapéutico y uno o más agentes terapéuticos adicionales tal como un agente quimioterapéutico. Por ejemplo, un compuesto de la Fórmula I como se define en la presente y un agente terapéutico adicional se pueden administrar en una sola formulación. Otras combinaciones también están incluidas en la terapia de combinación. Si bien los dos o más agentes en la terapia de combinación se pueden administrar simultáneamente, no es necesario que se administren. Por ejemplo, la administración de un primer agente (o una combinación de agentes) puede preceder a la administración de un segundo agente (o una combinación de agentes) en minutos, horas, días o semanas. Por lo tanto, los dos o más agentes pueden administrarse en minutos entre sí o dentro de 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 o 24 horas entre sí o dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 días entre sí o dentro de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 semanas entre sí. En algunos casos, son posibles intervalos incluso más largos. Aunque en muchos casos es deseable que los dos o más agentes usados en una terapia de combinación estén presentes dentro del cuerpo del paciente al mismo tiempo, no es necesario que sea así.

La terapia de combinación también puede incluir dos o más administraciones de uno o más de los agentes usados en la combinación usando diferentes secuencias de los agentes componentes. Por ejemplo, si el agente X y el agente Y se usan en una combinación, uno podría administrarlos secuencialmente en cualquier combinación una o más veces, por ejemplo, en el orden X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y-Y-X, X-X-Y-Y, etc.

La terapia de combinación también puede incluir dos o más administraciones de uno o más de los agentes usados en la combinación usando diferentes vías de administración. Cada uno de uno o más de los agentes puede administrarse independientemente oralmente, subcutáneamente, tópicamente, parenteralmente, por aspersión inhalación o de forma rectal en formulaciones de dosis unitarias que contienen portadores farmacéuticamente aceptables no tóxicos, convencionales, adyuvantes y vehículos. La administración parenteral puede incluir inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas o intramusculares o técnicas de infusión.

En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula I como se describe en la presente, se combinan con asparaginasa (ASNasa, L-asparaginasa) o sus derivados. En algunas modalidades, la asparaginasa se obtiene de *Erwinia chrysanthemi* y se conoce como crisantaspasa o asparaginasa *Erwinia chrysanthemi*. La asparaginasa *Erwinia chrysanthemi* se vende bajo las marcas comerciales Erwinaze® o Erwinase®. En algunas modalidades, la asparaginasa se obtiene de *Escherichia coli* y se conoce como colaspasa. Colaspasa se vende bajo las marcas comerciales Elspar®, Leunase®, Kidrolase®, o Spectrila® (E. coli asparaginasa recombinante). Los derivados pegilados de colaspasa son pegaspargasa, vendidos bajo la marca comercial Oncaspar®, y

calaspargasa pegol – mnkl, que se vende bajo la marca comercial Asparlas®. Otros productos de asparaginasa actualmente en desarrollo preclínico o clínico incluyen JZP-458 (Erwinia asparaginasa recombinante), PF745 (JZP-341), eriaspasa (GRASPA®), y Xoncane.

En algunas modalidades, los compuestos de la Fórmula I como se definen en la presente, se combinan con un agente inmunomodulador. En algunas modalidades, el inmunomodulador mejora la respuesta inmunitaria adaptativa. En algunas modalidades, el inmunomodulador mejora la actividad de las células presentadoras de antígenos. En algunas modalidades, el agente inmunomodulador mejora la actividad antitumoral de las células mieloides, incluyendo los macrófagos. En algunas modalidades, el inmunomodulador mejora la actividad antitumoral de las células Natural Killer. En algunas modalidades, el agente inmunomodulador mejora la actividad de las células T efectoras, incluidas las células T citotóxicas.

En algunas modalidades, el uno o más agentes terapéuticos adicionales que pueden administrarse en combinación con un compuesto proporcionado en la presente puede ser un inhibidor de la trayectoria de MAPK. Dichos inhibidores de la trayectoria de MAPK incluyen, por ejemplo, inhibidores de MEK, inhibidores de ERK, e inhibidores de Ras.

Los inhibidores de MEK ejemplares incluyen, pero no se limitan a, trametinib, selumetinib, cobimetinib, binimetinib, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los inhibidores de ERK ejemplares incluyen pero no se limitan a, ulixertinib, SCH772984, LY3214996, ravoxertinib, VX-11e, ASN-007, GDC-0994, MK-8353, ASTX-029, LTT462, KO-947, y sus sales farmacéuticamente aceptables. Los inhibidores de Ras ejemplares incluyen pero no se limitan a, AMG-510, MRTX849, ARS-1620, ARS-3248, LY3499446, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes inmunomoduladores que incluyen pero no se limitan a terapéuticos anti-PD-1 o anti-PDL-1 que incluyen pembrolizumab, nivolumab, pidilizumab, cemiplimab, atezolizumab, durvalumab, BMS-936559, o avelumab. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser terapéuticos anti-TIM3 (anti-HAVcr2) incluyendo más no limitándose a terapéuticos TSR-022 o MBG453, anti-LAG3 incluyendo más no limitándose a relatlimab, LAG525, o TSR-033, anti-4-1BB (anti-CD37, anti-TNFRSF9), terapéuticos agonistas de CD40 incluyendo más no limitándose a SGN-40, CP-870,893 o RO7009789, terapéuticos anti-CD47 incluyendo más no limitándose a Hu5F9-G4, terapéuticos anti-CD20, terapéuticos anti-CD38, agonistas de STING incluyendo, más no limitándose a ADU-S100, MK-1454, ASA404, o amidobenzimidazoles. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes anti-CTLA4 que incluyen ipilimumab, tremelimumab. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes hipometilantes que incluyen, pero no se limitan a, azacitidina o decitabina, otros terapéuticos inmunomoduladores que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores del factor de crecimiento

epidérmico, estatinas, metformina, bloqueadores de los receptores de angiotensina, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, prednisona o dexametasona. En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes inmunoterapéuticos incluyendo agentes terapéuticos dirigidos, vacunas para el cáncer, y terapia de células CAR-T.

5 Los compuestos de la Fórmula I como se describe en la presente se administran en combinación con otros agentes terapéuticos conocidos para tratar tipos de cáncer. Dichos otros agentes terapéuticos incluyen e radioterapia, agentes antitubulina, agentes alquilantes de ADN, agentes inhibidores de la síntesis de ADN, agentes intercalantes de ADN, agentes antiestrógenos, antiandrógenos, esteroides, agentes anti-EGFR, inhibidores de quinasa, inhibidores de mTOR, inhibidores de PI3 quinasa, inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina, inhibidores de la quinasa CD4/CD6, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC), inhibidores de la metilación del ADN, agentes anti-HER2, agentes antiangiogénicos, inhibidores del proteasoma, inhibidores de PARP (poli ADP ribosa polimerasa), inhibidores de la quinasa que regulan el ciclo celular, talidomida, lenalidomida, pomalidomida, bortezomib, carfilzomib, ixazomib, 10 daratumumab, daratumumab / hialuronidasa, isatuximab, dexametasona, y conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs).

En una modalidad, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes quimioterapéuticos incluyendo más no limitándose a un agente antitubulina (por ejemplo, paclitaxel, partículas unidas a proteínas de paclitaxel para suspensión inyectable, incluidos nab-paclitaxel, eribulina, docetaxel, ixabepilona, vincristina, auristatinas o maitansinoides), vinorelbina, agentes alquilantes del ADN (incluidos cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ciclofosfamida, ifosfamida, temozolomida), agentes intercalantes del ADN o inhibidores de la topoisomerasa del ADN (incluyendo antraciclinas como doxorrubicina, doxorrubicina liposomal pegilada, daunorrubicina, idarrubicina, mitoxantrona o epirubicina, camptotecinas como topotecán, irinotecán o exatecán), 5- 20 fluorouracilo, capecitabina, citarabina, decitabina, 5-aza citadina, gemcitabina y metotrexato.

En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser inhibidores de quinasa que incluyen, pero no se limitan a erlotinib, gefitinib, neratinib, afatinib, osimertinib, lapatanib, crizotinib, brigatinib, ceritinib, alectinib, lorlatinib, everolimus, temsirolimus, abemaciclib, LEE011, palbociclib, cabozantinib, ripretinib, sunitinib, pazopanib, sorafenib, regorafenib, sunitinib, axitinib, dasatinib, imatinib, nilotinib, idelalisib, ibrutinib, BLU-667, Loxo 292, 30 larotrectinib, y quizartinib,

En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes antiestrógenos, incluyendo pero no limitándose a tamoxifeno, fulvestrant, anastrozol, letrozol y exemestano, agentes antiandrógenos, incluyendo más no limitándose a acetato de abiraterona, 35 enzalutamida, nilutamida, bicalutamida, flutamida, acetato de ciproterona, agentes esteroides,

incluyendo más no limitándose a, prednisona y dexametasona, inhibidores de PARP, incluyendo más no limitándose a, neraparib, olaparib, talazoparib y rucaparib, inhibidores de la topoisomerasa I, incluyendo más no limitándose a, irinotecán, camptotecina, exatecán y topotecán, inhibidores de la topoisomerasa II, incluyendo más no limitándose a, antraciclinas, etopósido, fosfato de etopósido y mitoxantrona, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), incluyendo más no limitándose a, vorinostat, romidepsina, panobinostat, ácido valproico y belinostat, inhibidores de la metilación del ADN, incluyendo más no limitándose a DZNep y 5-aza-2'-desoxicitidina, inhibidores del proteosoma incluyendo más no limitándose a, bortezomib y carfilzomib, agentes biológicos incluyendo más no limitándose a, trastuzumab, ado-trastuzumab, pertuzumab, cetuximab y panitumumab.

En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes anti-angiogénicos incluyendo bevacizumab, aflibercept, y AMG386.

En algunas modalidades, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser conjugados de anticuerpo y fármaco (ADCs) incluyendo DM1, DM4, MMAE, MMAF, o cargas útiles de camptotecina, brentuximab vedotina y trastuzumab emtansina, radioterapia, vacunas terapéuticas que incluyen, pero no limitándose a, sipuleucel-T.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede ser un inhibidor de la autofagia, incluyendo los inhibidores de ULK, los inhibidores de VPS34, los inhibidores de PIKfyve, los inhibidores de PPT1 o los agentes bloqueantes lisosomales. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede ser DCC-3116, SAR405, SB02024, hidroxiclороқуина, cloroquina, apilimod, MRT403, y LYS05.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se selecciona de un análogo de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), que incluye goserelina y leuprolida.

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en everolimus, trabectedina, abraxano, TLK 286, AV-299, DN-101, pazopanib, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244 (ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, enzastaurina, vandetanib, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, pemetrexed, erlotinib, dasatanib, nilotinib, decatanib, panitumumab, amrubicina, oregovomab, Lep-etu, nolatrexed, AZD 2171, batabulina, de atumtunab, zanolimumab, edotecarina, tetrandrina, rubitecán, tesmilifeno, oblimersen, ticilimumab, ipilimumab, gossypol, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, cilengitida, gimatecán, IL13-PE38QQR, INO 1001, IPdR1 KRX-0402, lucantona, LY 317615, neuradiab, vitespan, Rta 744, alanosina (Sdx 102), tlampanel, atrasentan, XR 311, romidepsin, ADS-100380, sunitinib, 5-fluorouracilo, vorinostat, etopósido, gemcitabina, doxorubicina, irinotecán, doxorubicina liposomal, 5'-desoxi-5-fluorouridina, vincristina, temozolomida, ZK-304709, seliciclib; PD0325901, AZD-6244, capecitabina, ácido L-Glutámico, N-[4-[2-(2-amino-4,7-

dihidro-4-oxo-1H-pirroló[2,3-d]pirimidin-5-il)-etil]benzoil]-, sal disódica, heptahidrato, camptotecina, irinotecán etiquetado con PEG, tamoxifeno, citrato de toremifeno, anastrozola, exemestano, letrozola, DES(dietilstilbestrol), estradiol, estrógeno, estrógeno conjugado, bevacizumab, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(metilsulfonilpiperadinmetil)-indolil]-quinolona, vatalanib, AG-013736, AVE-0005, la

5 sal de acetato de [D-Ser(tBu) 6, Azgly 10] (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ acetato [C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x en donde x=1 a 2.4], acetato de goserelina, acetato de leuprolida, pamoato de triptorelina, acetato de medroxiprogesterona, caproato de hidroxiprogesterona, acetato de megestrol, raloxifeno, bicalutamida, flutanida, nilutamida, acetato de megestrol, CP-724714; TAK-165, HKI-272, erlotinib, lapatanib, canertinib, anticuerpo ABX-EGF,

10 erbitux, EKB-569, PKI-166, GW-572016, ionafarnib, BMS-214662, tipifarnib; amifostina, NVP-LAQ824, ácido suberoil analida hidroxámico, ácido valproico, tricostatina A, FK-228, SU11248, sorafenib, KRN951, aminoglutetimida, arnsacrina, anagrelida, L-asparaginasa, vacuna contra Bacillus Calmette-Guerin (BCG), bleomicina, buserelina, busulfano, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clodronato, ciproterona, citarabina, dacarbacina, dactinomicina,

15 daunorubicina, dietilstilbestrol, epirubicina, fludarabina, fludrocortisona, fluoximesterona, flutamida, gemcitabina, gleevac, hidroxíurea, idarubicina, ifosfamida, imatinib, leuprolida, levamisola, lomustina, mecloretamina, melfalan, 6-mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nilutamida, octreótido, oxaliplatino, pamidronato, pentostatina, plicamicina, porfímero, procarbazona, raltitrexed, rituximab, estreptozocina, tenipósido, testosterona, talidomida, tioguanina,

20 tiotepa, tretinoína, vindesina, ácido 13-cis-retinoico, mostaza fenilalanina, mostaza uracilo, estramustina, altretamina, floxuridina, 5-desoxiuridina, citosina arabinosida, 6-mecaptopurina, desoxicoformicina, calcitriol, valrubicina, mitramicina, vinblastina, vinorelbina, topotecán, razoxina, marimastat, COL-3, neovastat, BMS-275291, escualamina, endostatina, SU5416, SU6668, EMD121974, interleucina-12, IM862, angiostatina, vitaxina, droloxifeno, idoxifeno, espironolactona,

25 finasterida, cimitidina, trastuzumab, denileucina diftotox, gefitinib, bortezomib, irinotecán, topotecán, doxorubicina, docetaxel, vinorelbina, bevacizumab (anticuerpo monoclonal) y erbitux, paclitaxel sin cremophor, epitilona B, BMS-247550, BMS-310705, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, pipendoxifeno, ERA-923, arzoxifeno, fulvestrant, acolbifeno, lasofoxifeno, idoxifeno, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, rapamicina, 40-O-(2-hidroxi-etil)-rapamicina, temsirolimus,

30 AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, wortmannin, ZM336372, L-779450, PEG-filgrastim, darbepoetina, eritropoyetina, factor estimulador de la colonia de granulocitos, zolendronato, prednisona, cetuximab, factor estimulador de la colonia de macrófagos granulocitos, histrelin, interferón alfa-2a pegilado, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b pegilado, interferón alfa-2b, azacitidina, PEG-L-asparaginasa, lenalidomida, gemtuzumab,

35 hidrocortisona, interleucina-11, dexrazoxana, alemtuzumab, ácido todo-transretinoico, ketoconazol,

interleucina-2, megestrol, inmunoglobulina, mostaza nitrógeno, metilprednisolona, ibritumomab tiuxetán, andrógenos, decitabina, hexametilmelamina, bexaroteno, tositumomab, trióxido arsénico, cortisona, editronato, mitotano, ciclosporina, daunorubicina liposomal, Edwina-asparaginasa, estroncio 89, casopitant, netupitant, un antagonista del receptor NK-1, palonosetron, aprepitant, difenhidramina, hidroxizina, metoclopramida, lorazepam, alprazolam, haloperidol, droperidol, dronabinol, dexametasona, metilprednisolona, proclorperazina, granisetron, ondansetron, dolasetron, tropisetron, pegfilgrastim, eritropoyetina, epoetina alfa y darbepoetina alfa, ipilimumab, y sus mezclas.

10 *Composiciones y Kits farmacéuticos*

Otro aspecto de esta descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos como se describen en la presente formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. En particular, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos como se describen en la presente formulados juntos con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Estas formulaciones incluyen aquellas adecuadas para administración oral, rectal, tópica, bucal, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica, o intravenosa) rectal, vaginal, o en aerosol, aunque la forma más adecuada de administración en cualquier caso determinado dependerá del grado y la severidad de la condición que se va a tratar y de la naturaleza del compuesto particular que se utiliza. Por ejemplo, las composiciones que se describen se pueden formular como una dosis unitaria, y/o se pueden formular para administración oral o subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas ejemplares se pueden utilizar en forma de una preparación farmacéutica, por ejemplo, en forma sólida, semisólida o líquida, que contiene uno o más de los compuestos descritos en la presente, como un ingrediente activo, en mezcla con un portador o excipiente orgánico o inorgánico adecuado para aplicaciones externas, entéricas o parenterales. El ingrediente activo puede ser compuesto, por ejemplo, con los portadores farmacéuticamente aceptables, no tóxicos usuales para tabletas, comprimidos, cápsulas, supositorios, soluciones, emulsiones, suspensiones, y cualquier otra forma adecuada para uso. El compuesto objetivo activo se incluye en la composición farmacéutica en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o la condición de la enfermedad.

Para preparar las composiciones sólidas tal como tabletas, el ingrediente activo principal puede ser mezclado con un portador farmacéutico, por ejemplo, ingredientes convencionales formadores de tabletas tal como almidón de maíz, lactosa, sacarosa, sorbitol, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, fosfato dicálcico o gomas, y otros diluyentes farmacéuticos, por ejemplo, agua, para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla

homogénea de un compuesto proporcionado en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable no tóxica del mismo. Cuando se hace referencia a dichas composiciones de preformulación como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo está disperso de forma uniforme a través de toda la composición de tal manera que la composición se pueda subdividir fácilmente en formas de
5 dosis unitarias igualmente eficaces tales como pastillas, píldoras y cápsulas.

En las formas de dosificación sólida para la administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, dulces, polvos, gránulos y similares), la composición en cuestión se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de lo siguiente: (1) llenadores o extendedores, tal como almidones, lactosa, sacarosa,
10 glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de solución, tal como parafina; (6) aceleradores de absorción, tal como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes
15 humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tal como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilen glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones también pueden comprender agentes reguladores de pH. También se pueden emplear
20 composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Una tableta puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo,
25 gelatina o hidroxibutilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, almidón glicolato sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensoactivo o dispersante. Las tabletas moldeadas se pueden hacer al moldear en una máquina adecuada una mezcla de la composición en cuestión humedecida con un diluyente líquido inerte. Las tabletas, y otras formas de dosificación sólida, tal como dulces, cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden marcar
30 o preparar opcionalmente con revestimientos y capas, tal como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes farmacéuticamente aceptables, acuosos u orgánicos o mezclas de los mismos, y polvos. Las formas de dosificación líquida para la administración oral incluyen emulsiones,
35 microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.

Además de la composición en cuestión, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo , acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, aceites (en particular, semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, aceite de ricino y de ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilen glicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, ciclodextrinas y mezclas de los mismos.

Las suspensiones, además de la composición en cuestión, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden ser presentadas como un supositorio, que se puede preparar al mezclar una composición en cuestión con uno o más excipientes adecuados no-irritantes o portadores que comprenden, por ejemplo, mantequilla de cacao, polietilen glicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que son sólidas a temperatura ambiente, pero líquidas a temperatura corporal, y por lo tanto se fundirán en la cavidad del cuerpo y liberarán al agente activo.

Las formas de dosificación para la administración transdérmica de una composición en cuestión incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El componente activo puede ser mezclado bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservador, reguladores de pH o propulsores que puedan ser requeridos.

Los ungüentos, pastas, cremas , y geles pueden contener, además de una composición en cuestión, excipientes, tales como las grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilen glicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o sus mezclas.

Los polvos y aerosoles pueden contener, además de una composición en cuestión, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

Las composiciones y los compuestos de la presente descripción pueden ser administrados alternativamente por medio de aerosol. Esto se logra al preparar un aerosol acuoso, preparación liposomal o partículas sólidas que contienen el compuesto. Una suspensión no acuosa (por ejemplo, propulsor de fluorocarbono) podría ser utilizada. Los nebulizadores sónicos pueden ser

utilizados porque reducen al mínimo la exposición del agente a cizalladura, que puede tener como resultado degradación de los compuestos contenidos en las composiciones en cuestión. Comúnmente, un aerosol acuoso se hace al formular una solución o suspensión acuosa de una composición en cuestión junto con portadores y estabilizadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Los portadores y los estabilizadores varían con los requisitos de la composición en cuestión particular, pero incluyen típicamente agentes tensoactivos no iónicos (Tweens, Pluronic, o polietilén glicol), proteínas inocuas como albúmina de suero, ésteres de sorbitán, ácido oleico, lecitina, aminoácidos tales como glicina, reguladores de pH, sales, azúcares o alcoholes de azúcar. Los aerosoles se preparan por lo general de soluciones isotónicas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción adecuadas para la administración parenteral comprenden una composición en cuestión en combinación con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones o polvos estériles que pueden ser reconstituídos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, reguladores de pH, bacteriostáticos, solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de los portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden ser empleados en las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente incluyen agua, etanol, polioles (tal como, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y lo similar) y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo y ciclodextrinas. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de las dispersiones y mediante el uso de agentes tensoactivos.

En otra modalidad, se proporcionan formulaciones farmacéuticas entéricas que incluyen un compuesto descrito y un material entérico; y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable de las mismas. Los materiales entéricos se refieren a polímeros que son sustancialmente insolubles en el entono ácido del estómago, y que son predominantemente solubles en los fluidos intestinales a pH específicos. El intestino delgado es la parte del tracto gastrointestinal (intestino) entre el estómago y el intestino grueso, e incluye el duodeno, yeyuno, y el íleon. El pH del duodeno es de aproximadamente 5.5, el pH del yeyuno es de aproximadamente 6.5 y el pH del íleon distal es de aproximadamente 7.5.

Asimismo, los materiales entéricos son no solubles, por ejemplo, hasta un pH de aproximadamente 5.0, de aproximadamente 5.2, de aproximadamente 5.4, de aproximadamente 5.6, de aproximadamente 5.8, de aproximadamente 6.0, de aproximadamente 6.2, de aproximadamente 6.4, de aproximadamente 6.6, de aproximadamente 6.8, de aproximadamente

7.0, de aproximadamente 7.2, de aproximadamente 7.4, de aproximadamente 7.6, de aproximadamente 7.8, de aproximadamente 8.0, de aproximadamente 8.2, de aproximadamente 8.4, de aproximadamente 8.6, de aproximadamente 8.8, de aproximadamente 9.0, de aproximadamente 9.2, de aproximadamente 9.4, de aproximadamente 9.6, de aproximadamente 9.8, o de aproximadamente 10.0. Materiales entéricos ejemplares incluyen acetato ftalato de celulosa (CAP), ftalato de hidroxipropil metilcelulosa (HPMCP), acetato ftalato de polivinilo (PVAP), acetato succinato de hidroxipropil metilcelulosa (HPMCAS), acetato trimelitato de celulosa, succinato de hidroxipropil metilcelulosa, acetato succinato de celulosa, acetato hexahidroftalato de celulosa, propionato ftalato de celulosa, acetato maleato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato propionato de celulosa, copolímero de ácido metilmetacrílico y metil metacrilato, copolímero de metil acrilato, metilmetacrilato y ácido metacrílico, copolímero de éter metilvinílico y anhídrido maleico (serie Gantrez ES), copolímero de etil metiacrilato-metilmetacrilato-clorotrimetilamonio etil acrilato, resinas naturales tal como zeina, goma laca y copal collophorium, y varios sistemas de dispersión entéricos comercialmente disponibles (por ejemplo, Eudragit L30D55, Eudragit FS30D, Eudragit L100, Eudragit S100, Kollicoat EMM30D, Estacryl 30D, Coateric, y Aquateric). La solubilidad de cada uno de los materiales antes mencionados es sabido o es fácilmente determinable in vitro. Lo anterior es una lista de posibles materiales, pero un experto en la técnica con el beneficio de la descripción reconocería que no es completa y que hay otros materiales entéricos que alcanzarían los objetivos descritos en la presente.

De manera ventajosa, en la presente se proporcionan kits para uso, por ejemplo, por un consumidor que necesita tratamiento para el cáncer. Dichos kits incluyen una forma de dosificación adecuada tal como la que se describió anteriormente y las instrucciones que describen el método para utilizar dicha forma de dosificación para mediar, reducir o prevenir la inflamación. Las instrucciones dirigirían al consumidor o al personal médico a administrar la forma de dosificación de acuerdo con los modos de administración conocidos por los expertos en la técnica. Dichos kits podrían ser empacados y vendidos de manera ventajosa en unidades del kit únicas o múltiples. Un ejemplo de dicho kit es un empaque blister o de burbuja así denominado. Los empaques de burbuja son bien conocidos en la industria de empackado y se utilizan ampliamente para el empaque de formas de dosificación unitaria farmacéuticas (tabletas, cápsulas, y similares). Los empaques de burbuja por lo general consisten en una hoja de material relativamente rígido cubierto con una lámina de un material de plástico preferiblemente transparente. Durante el procedimiento de empackado se forman huecos en la hoja de plástico. Los huecos tienen el tamaño y la forma de las tabletas o cápsulas que se van a empackar. Luego, las tabletas o las cápsulas son colocadas en los huecos y la hoja de material relativamente rígido se sella contra la lámina de plástico en la cara de la lámina que está opuesta desde la dirección en donde se forman los huecos. Como resultado, las

tabletas o las cápsulas se sellan en los huecos entre la lámina de plástico y la hoja. Preferiblemente la fuerza de la hoja es tal que las tabletas o las cápsulas se pueden remover del empaque de burbuja al aplicar presión manualmente en los huecos por lo cual se forma una abertura en la hoja en el lugar del hueco. La tableta o la cápsula entonces se puede remover por medio de dicha

5 abertura.

Puede ser deseable proporcionar un auxiliar de recordatorio en el kit, por ejemplo, en la forma de números cerca de las tabletas o cápsulas donde los números correspondan con los días del régimen a seguir en la ingestión de las pastillas o cápsulas que se especifican. Otro ejemplo de dicho auxiliar de memoria es un calendario impreso en la tarjeta, por ejemplo, de la siguiente

10 forma "Primera Semana, Lunes, Martes, . . . etc. . . . Segunda Semana, Lunes, Martes, . . . " etc. Otras variaciones de los auxiliares de memoria serán fácilmente aparentes. Una "dosis diaria" puede ser una sola tableta o cápsula o varias píldoras o cápsulas que se van a tomar en un día determinado. También, una dosis diaria de un primer compuesto puede consistir en una tableta o la cápsula mientras una dosis diaria del segundo compuesto puede consistir en varias tabletas o

15 cápsulas y viceversa. El auxiliar de memoria debe reflejar esto.

EJEMPLOS

Los compuestos que se describen en la presente se pueden preparar de varias

20 maneras con base en las enseñanzas contenidas en la presente y las descripciones de los procedimientos sintéticos en la técnica. En la descripción de los métodos sintéticos descritos a continuación, debe entenderse que todas las condiciones de reacción propuestas, incluida la elección del disolvente, la atmósfera de reacción, la temperatura de reacción, la duración del experimento y los procedimientos de trabajo, se pueden elegir para que sean las condiciones estándar para esa

25 reacción, a menos que se indique lo contrario. Se entiende que un experto en la técnica de la síntesis de productos orgánicos que la funcionalidad presente en varias porciones de la molécula debe ser compatible con los reactivos y reacciones propuestos. Los sustituyentes no compatibles con las condiciones de reacción serán evidentes para el experto en la técnica y por lo tanto, se indican los métodos alternativos . Los materiales de inicio para los ejemplos están disponibles

30 comercialmente o se preparan fácilmente mediante métodos estándar a partir de materiales conocidos.

Las siguientes abreviaturas se utilizan en esta descripción y tienen las siguientes definiciones: "AcOH" es ácido acético, "ADP" es difosfato de adenosina, "Ar" es gas argón, "ASNasa" es asparaginasa, "Boc" es carbonato de *t*-butilo, "conc." es concentrado, "Cs₂CO₃" es carbonato de cesio, "DCM" es diclorometano, "DIAD" es azodicarboxilato de diisopropilo, "DIEA" es *N,N*-

35

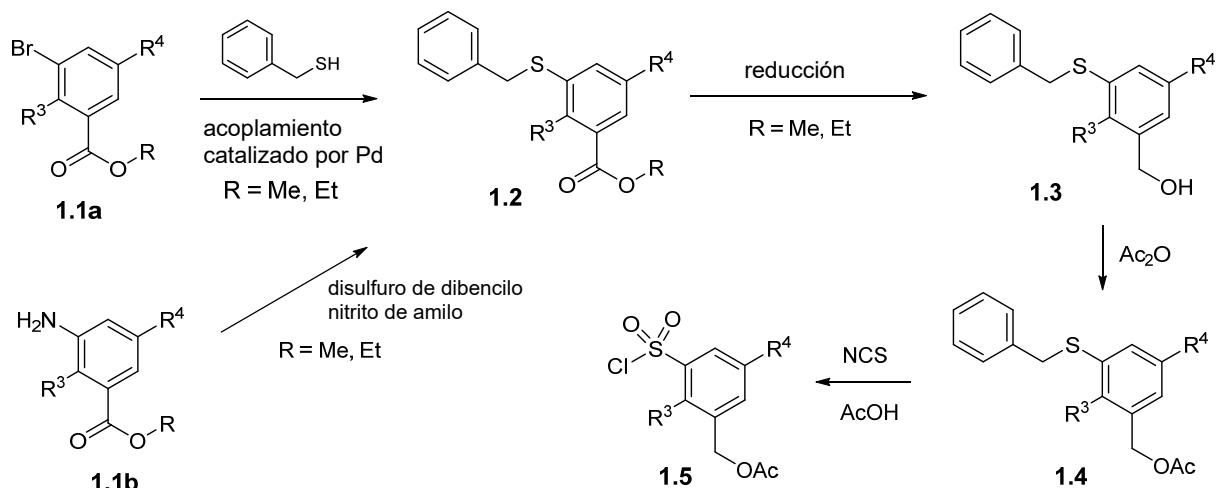
diisopropiletilamina, "DMF" es *N,N*-dimetilformamida, "dppf" es 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno, "DMSO" es dimetilsulfóxido, "EDTA" es ácido etilendiaminotetraacético, "ESI" es ionización por electropulverización, "EtOAc" es acetato de etilo, "EtOH" es etanol, "GST" es glutatión S-transferasa, "h" es hora u horas, "HCl" es ácido clorhídrico, "Hex" es hexano, "H₂O" es agua, "IC₅₀" es la mitad de la concentración inhibitoria máxima, "K₂CO₃" es carbonato de potasio, "KOAc" es acetato de potasio, "NaBH₄" es borohidruro de sodio, "LAH" es hidruro de litio y aluminio, "CH₃CN" es acetonitrilo, "*m*CPBA" es ácido 4-cloroperbenzoico, "MeOH" es metanol, "MHz" es megahertz, "min" es minuto o minutos, "MS" es espectrometría de masas, "NADH" es nicotinamida adenina dinucleótido, "NaH" es hidruro de sodio, "NaHCO₃" es bicarbonato de sodio, "NaNO₂" es nitrito de sodio, "NaOMe" es metóxido de sodio, "Na₂SO₄" es sulfato de sodio, "NBS" es *N*-bromosuccinimida, "NCS" es *N*-clorosuccinimida, "NH₄Cl" es cloruro de amonio, "NIS" es *N*-yodosuccinimida, "RMN" es resonancia magnética nuclear, "PBS" es solución salina regulada en su pH con fosfato, "Pd₂(dba)₃" es tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0), Pd(dppf)Cl₂ es dicloruro de 1,1-bis(difenilfosfino)ferrocenopaladio(II), "Ph₃P" es trifenilfosfina, "PMB" es *para*metoxibencilo, "POCl₃" es oxiclورو de fósforo, "rt" es temperatura ambiente, también conocida como "temperatura ambiente", que se entenderá que consiste en una escala de temperaturas normales de laboratorio que oscilan entre 15 y 25 °C, "sat" es saturado, "SDS" es dodecilsulfato de sodio, "SOCl₂" es cloruro de tionilo, "TEA" es trietilamina, "TFA" es ácido trifluoroacético, "THF" es tetrahidrofurano y "Xantphos" es 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno.

20

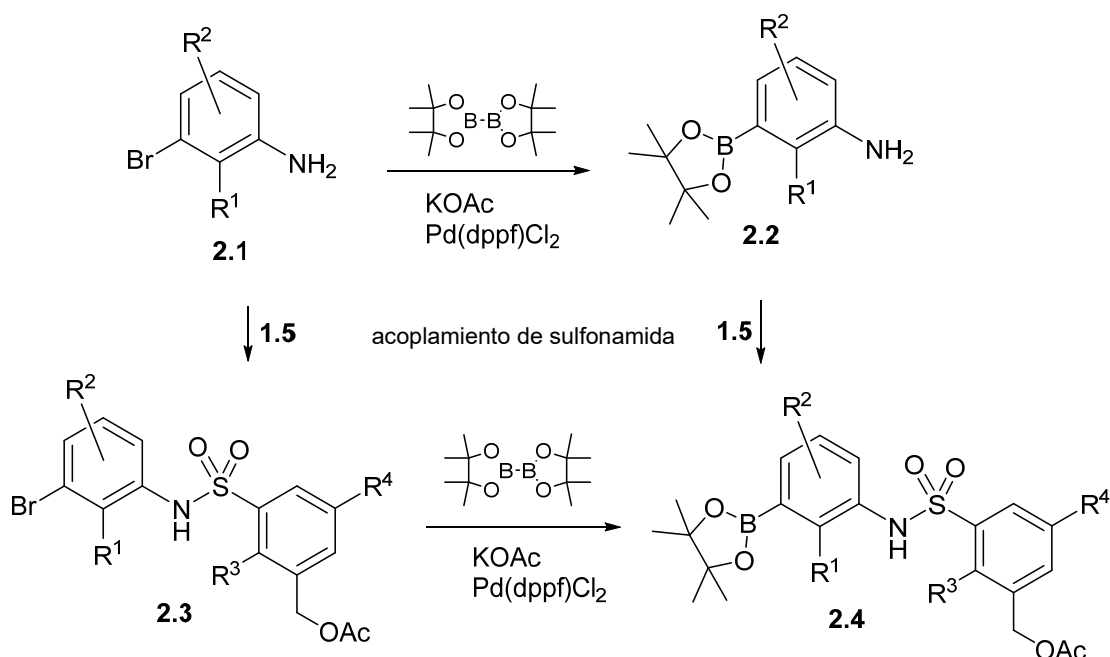
Química general

Los compuestos ejemplares descritos en la presente están disponibles por los métodos sintéticos generales ilustrados en los Esquemas que se presentan a continuación, preparaciones intermedias y los Ejemplos anexos.

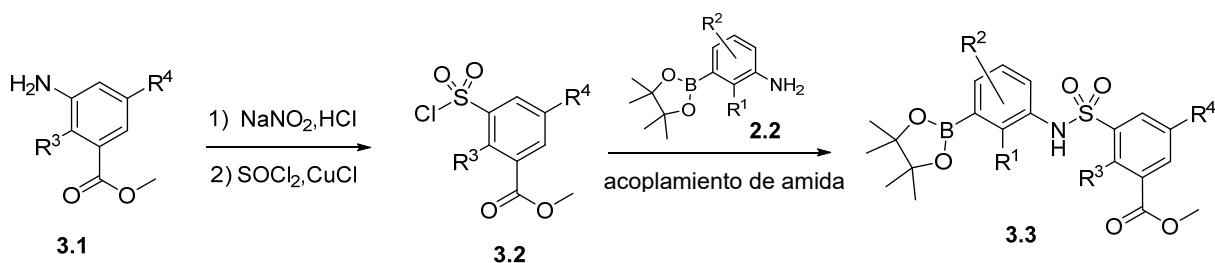
25

ESQUEMA 1

- 5 El Esquema 1 ilustra una preparación ejemplar de cloruros de sulfonilo **1.5**. Bromuros **1.1a** (comercialmente disponibles o sintetizados por los expertos en la técnica) se convierten en tio-éteres **1.2** por una reacción de acoplamiento catalizada por Pd (por ejemplo, usando Pd2(dba)3, XantPhos, fenilmetantiol en presencia de una base, tal como DIEA en un solvente como tolueno, y a temperatura elevada) Alternativamente, los compuestos **1.2** se pueden preparar
- 10 a partir de anilinas **1.1b** (comercialmente disponibles o sintetizadas por los expertos en la técnica) por medio de diazotización usando disulfuro de dibencilo y nitrito de amilo en CH3CN a temperatura elevada. La reducción de ésteres **1.2** (R = Me, Et) con agentes de reducción (LAH o NaBH4) produce alcoholes primarios **1.3**. El alcohol **1.3** se puede convertir en **1.4** por medio de reacción con anhídrido acético en presencia de una base, tal como DIEA. Finalmente, una oxidación suave de tio-
- 15 éteres **1.4** por medio de la combinación de NCS y AcOH produce los cloruros de sulfonilo correspondientes **1.5** de acuerdo con las condiciones de reacción generales reportadas en *Synthesis*, 2006, 24, 4131-4134 and *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 3447-3460.

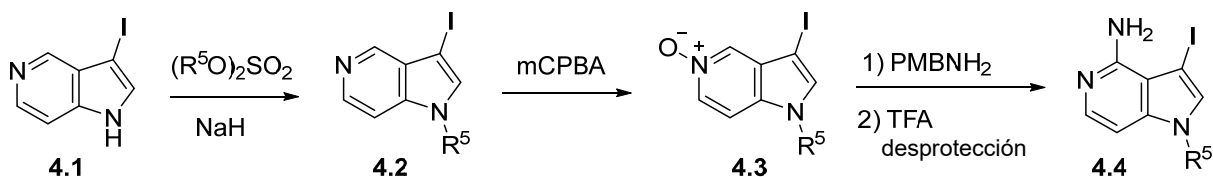
ESQUEMA 2

El Esquema 2 ilustra una preparación ejemplar de boronatos **2.4**. Los compuestos **2.1** (comercialmente disponibles, sintetizados como se describe en WO2013134298 o sintetizados por los expertos en la técnica) reaccionan con bis(pinacolato)diboro por reacción de borilación conocida por los expertos en la técnica (reacción mediada por paladio realizada utilizando catalizadores de paladio como Pd(dppf)Cl_2 , una base adecuada como KOAc en un solvente adecuado como 1,4-dioxano a temperatura elevada) para obtener los compuestos **2.2** que reaccionan con cloruros de sulfonilo **1.5** (véase el esquema 1) para dar los compuestos **2.4**. Alternativamente, los compuestos **2.1** reaccionan con cloruros de sulfonilo **1.5** para producir las sulfonamidas **2.3** que se convierten en boronatos **2.4** en las condiciones de reacción de borilación conocidas por los expertos en la técnica.

ESQUEMA 3

El Esquema 3 ilustra una preparación ejemplar de boronatos **3.3**. Los compuestos **3.2** se pueden preparar a partir de anilinas **3.1** (comercialmente disponibles o sintetizados por los expertos en la técnica) por medio de diazotización, seguida de cloración mediada por Cu del intermediario resultante (de acuerdo con las condiciones de reacción generales reportadas en *Org. Proc. Res. Dev.*, 2009, 5, 875-879). Los cloruros de sulfonilo **3.2** reaccionan con aminas **2.2** bajo acoplamiento de sulfona amida para obtener sulfonamidas **3.3**.

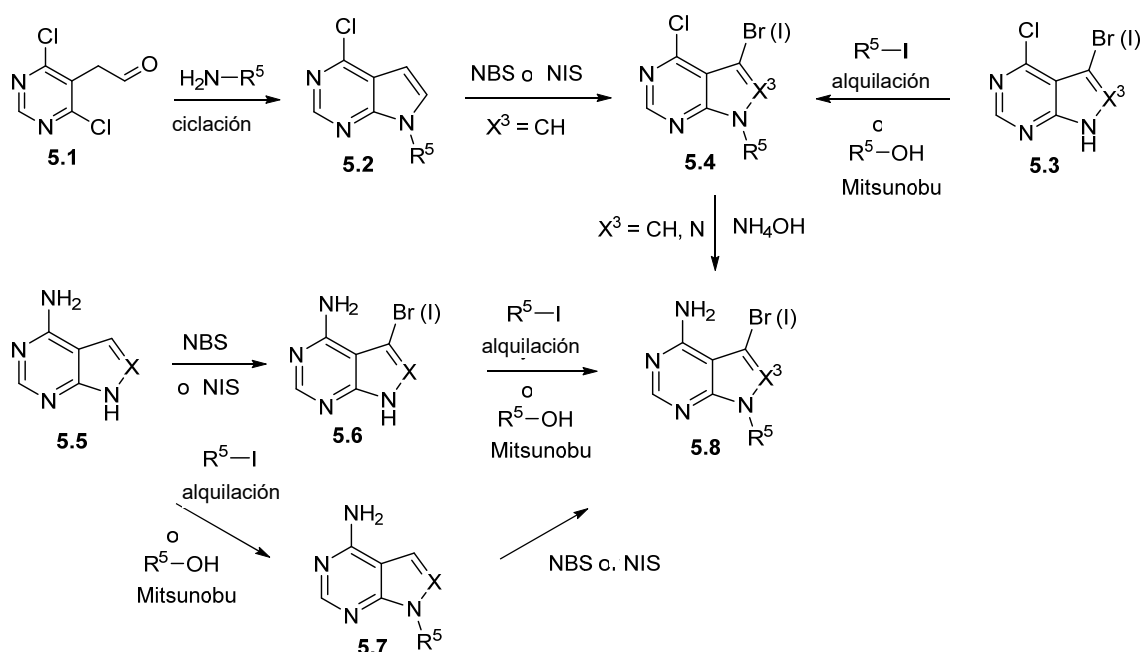
ESQUEMA 4



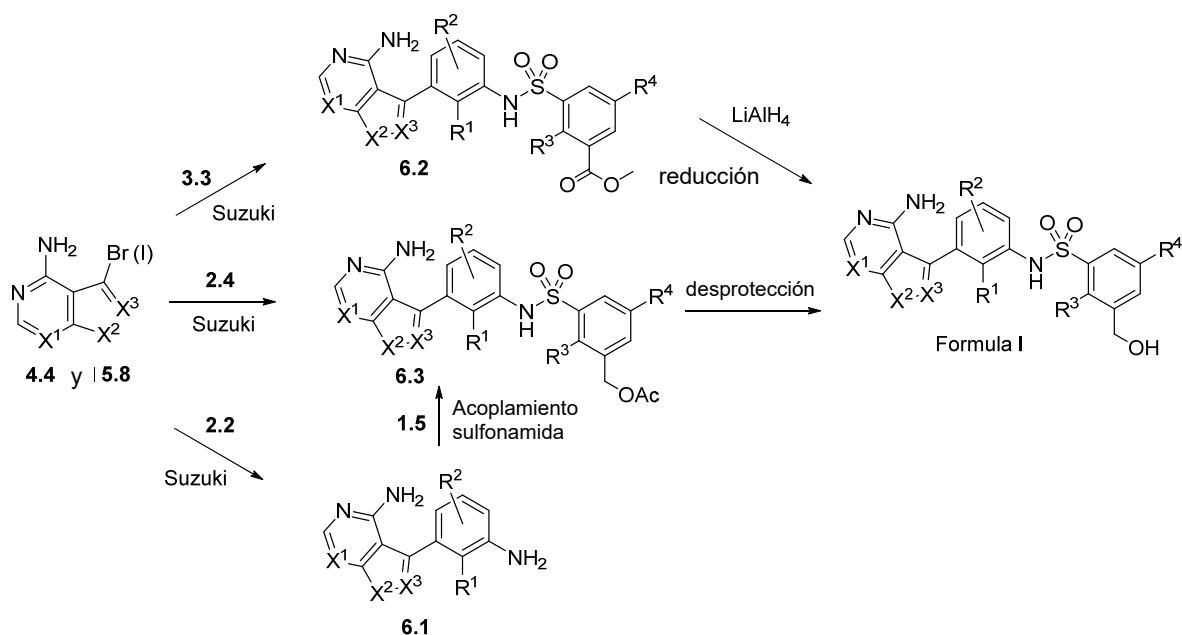
10

El Esquema 4 ilustra una preparación ejemplar de los intermediarios **4.4**. La N-alquilación de la 3-yodo-1H-pirrol[3,2-c]piridina **4.1** con reactivo alquilante $(R^5O)_2SO_2$ en presencia de una base tal como NaH da **4.2**. Los compuestos **4.2** se pueden activar por medio de oxidación conocida en la técnica tal como mCPBA en DCM para producir N-óxidos **4.3**. Los N-óxidos de pirrolopiridina **4.3** se convierten en aminopirrolopiridinas **4.4** utilizando una mezcla de PMBNH₂ y cloruro de p-toluensulfonilo seguido por desprotección in situ con TFA.

15

ESQUEMA 5

El Esquema 5 ilustra una preparación ejemplar de los intermediarios **5.8**. La ciclación de 2-(4,6-dicloropirimidin-5-il)acetaldehído **5.1** con varias aminas ($\text{R}^5\text{-NH}_2$) en presencia de una base tal como TEA en un solvente prótico tal como EtOH a temperatura elevada da los compuestos **5.2**. La bromación (o yodación) de **5.2** con NBS (o NIS) da los compuestos **5.4** ($\text{X} = \text{CH}$). Los compuestos **5.5** reaccionan con NBS (o NIS) para dar **5.6**. La alquilación de los compuestos **5.3**, **5.5** y **5.6** reactivos alquilantes ($\text{R}^5\text{-I}$) da **5.4**, **5.7** y **5.8** respectivamente. Alternativamente, los compuestos **5.3**, **5.5** y **5.6** reaccionan con alcoholes ($\text{R}^5\text{-OH}$) bajo condiciones de Mitsunobu estándar (realizadas por ejemplo en presencia de Ph_3P y DIAD) y producen **5.4**, **5.7** y **5.8** respectivamente. En otra modalidad, los intermediarios **5.8** también se pueden preparar a partir de **5.4** por reacción de sustitución con hidróxido de amonio y de **5.7** por bromación (o yodación) con NBS (o NIS).

ESQUEMA 6

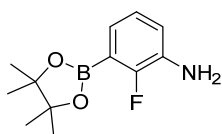
El Esquema 6 ilustra una preparación ejemplar de la **Fórmula I**. Bromuros (o yoduros) **4.4** y **5.8** reaccionan con boronatos **2.2** en presencia de un catalizador de paladio (condiciones de Suzuki) para dar anilinas **6.1**. La reacción de acoplamiento de sulfonamida de anilinas **6.1** con cloruros de sulfonilo **1.5** dan sulfonamidas **6.3**. Alternativamente, **6.3** se puede preparar a partir de bromuros (o yoduros) **4.4** y **5.8** con boronatos **2.4** bajo condiciones de Suzuki. La desprotección de sulfonamidas **6.3** con K₂CO₃ en un solvente prótico tal como MeOH a temperatura ambiente da la **Fórmula I**. En otra modalidad, los bromuros (o yoduros) **4.4** y **5.8** reaccionan con boronatos **3.3** en presencia de un catalizador de paladio (condiciones de Suzuki) para dar **6.2**. Reducción de **6.2** bajo LiAlH₄ para dar los alcoholes primarios, **Fórmula I**.

Preparación de los Intermediarios y Compuestos Finales.

Al utilizar los procedimientos y métodos sintéticos descritos en la presente y los métodos conocidos por los expertos en la técnica, se hicieron los siguientes compuestos:

Método general A: Borilación

Ejemplo **A1**: 2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina

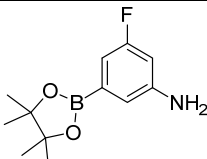
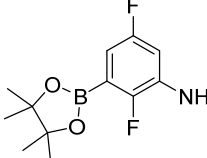
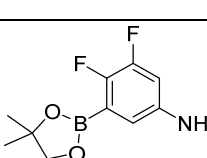
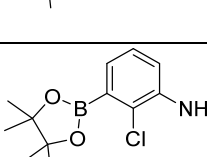


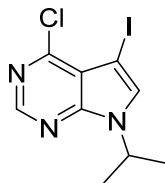
Una mezcla de KOAc (4.6 g, 47.4 mmoles), 3-bromo-2-fluoroanilina (3.0 g, 15.8

- mmoles), y 4,4,4',4',5,5,5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (4.8 g, 18.9 mmoles) en 1,4-dioxano (30 mL) se desgasificó con Ar durante 10 min. Se agregó aducto de PdCl₂(dppf) DCM (1.3 g, 1.6 mmoles) y la mezcla de reacción se calentó a 110 °C durante 6 h. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se eliminó bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (0 a 50% de EtOAc/hex) para obtener 2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (2.7 g, 72%) como un sólido tostado. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 6.86 (m, 2H), 6.76 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 1.28 (s, 12H); MS (ESI) m/z: 238.2 (M+H⁺).

- Utilizando el Método General A anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro A.

CUADRO A

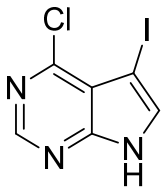
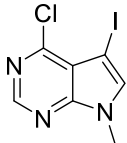
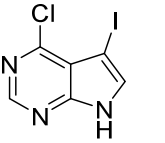
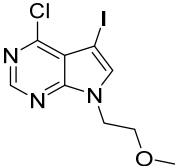
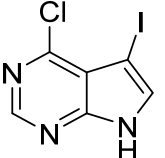
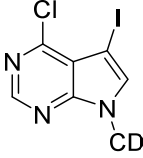
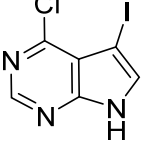
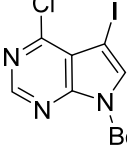
Ej No	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
A2		88	6.77 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.42 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 1.27 (s, 12H).	238.2
A3		crudo	Sin datos	256.2
A4		36	6.59 (m, 2H), 5.20 (br s, 2H), 1.28 (s, 12H).	256.1
A5		43	6.99 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.25 (br s, 2H), 1.28 (s, 12H).	254.1

Método General B: AlquilaciónEjemplo **B1**: 4-cloro-5-yodo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

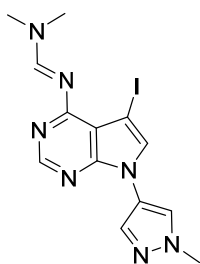
- Una solución de 4-cloro-5-yodo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (2.0 g, 7.2 mmoles) en
- 5 DMF (18 mL) se trató con Cs_2CO_3 (4.7 g, 14 mmoles). 2-Yodopropano (1.2 g, 7.2 mmoles) se agregó y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. La reacción se vertió en agua (100 mL) y los sólidos se recolectaron por medio de filtración al vacío para obtener 4-cloro-5-yodo-7-isopropil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1.8 g, 78%) como un sólido esponjoso amarillo. ^1H RMN (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.63 (s, 1H), 8.18 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 1.47 (d, $J = 6.8$ Hz, 6H); MS
- 10 (ESI) m/z : 322.0 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Utilizando el Método General B anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro B.

CUADRO B

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
B2			68	8.64 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 3.82 (s, 3H).	294.01
B3			74	8.64 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.99 (t, J = 1.5 Hz, 1H), 4.43 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H).	338.0
B4			crudo	8.65 (s, 1H), 7.98 (s, 1H).	Sin datos
B5			74	8.81 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 1.61 (s, 9H).	379.8

Preparación de **B6**: (E)-N'-(5-yodo-7-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida



5

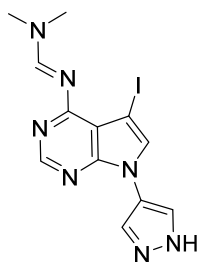
Una solución de 5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-amina (5.0 g, 19 mmoles.) en DMF (50 mL) se trató con N,N-dimetilformamida dimetil acetal (3.43 g, 28 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se diluyó con DCM (150 mL), se lavó con solución de salmuera (2x). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró. El material crudo se trituró con éter dietílico (100 mL) y los sólidos de filtraron para dar la (E)-N'-(5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida deseada (5.0 g, 85%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.9 (s, 1H),

10

8.80 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.41 (d, $J = 2.0$, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.17 (s, 3H); MS (ESI) m/z : 315.8 ($M+H^+$).

Una solución de (E)-N'-(5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida (2.0 g, 6.3 mmoles) y 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (1.6 g, 7.6 moles) en DMF (30 mL) en atmósfera de oxígeno se trató con NaHCO_3 (1.3 g, 12.6 mmoles), 2,2-bipiridilo (1.1 g, 6.9 mmoles) y $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ (1.3 g, 6.9 moles) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 días y se concentró bajo presión reducida. El material crudo se trituró con éter dietílico (60 mL) y los sólidos se filtraron para dar la (E)-N'-(5-yodo-7-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida deseada (3.0 g, cruda) que se utilizó para la siguiente reacción sin purificación adicional. MS (ESI) m/z : 395.8 ($M+H^+$).

Ejemplo **B7**: (E)-N'-(5-yodo-7-(1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida



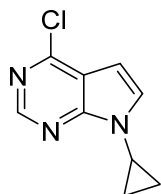
15

(E)-N'-(5-yodo-7-(1H-pirazol-4-il)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida se preparó como el Ejemplo **B6** a partir de (E)-N'-(5-yodo-7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-il)-N,N-dimetilformimidamida (0.69 g, 2.2 mmoles) y 4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazolpirazol (0.5 g, 2.6 moles). MS (ESI) m/z : 381.8 ($M+H^+$).

20

Método General C: Ciclación

Ejemplo **C1**: 4-cloro-7-ciclopropil-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina



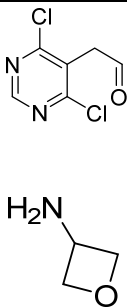
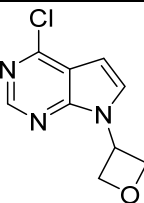
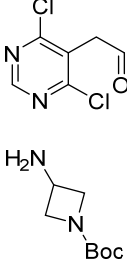
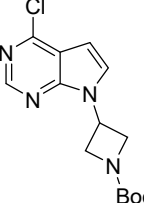
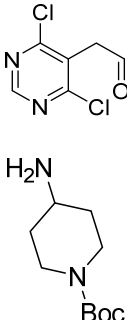
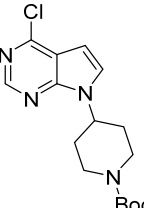
Una solución de 2-(4,6-dicloropirimidin-5-il)acetaldehído (2.0 g, 10.5 mmoles) en EtOH (18 mL) se trató con Et_3N (2.9 mL, 21 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, y luego se agregó ciclopropanamina (0.6 mL, 9.4 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a 140 °C durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura

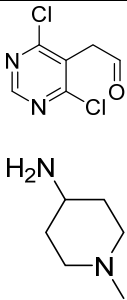
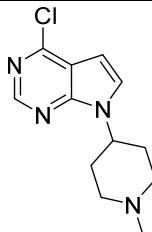
25

ambiente y luego se concentró bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice (0 a 100% de EtOAc/hex) para obtener 4-cloro-7-ciclopropil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (1.6 g, 79%) como un sólido color amarillo claro. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (s, 1H), 7.65 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 1.01-1.03 (m, 4H); MS (ESI) m/z : 194.0 ($M+H^+$).

Utilizando el Método General C anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro C.

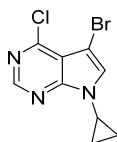
CUADRO C

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	^1H RMN (400 o 500 MHz, DMSO- d_6): δ	MS (m/z : $M+H^+$)
C2			73	8.67 (s, 1H), 8.18 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.98 (m, 1H), 5.02 (dd, J = 7.2, 1.6 Hz, 4H).	210.0
C3			38	Sin datos	309.2
C4			74	Sin datos	337.2

C5			91	8.66 (s, 1H), 7.84 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.94 (br m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.40 (m, 2H), 2.10 (m, 2H).	251.0
----	---	---	----	--	-------

Método General D: Bromación o Yodación

Ejemplo **D1**: 5-bromo-4-cloro-7-ciclopropil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina

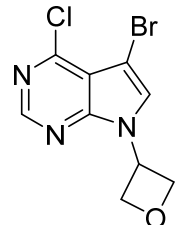
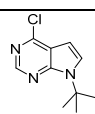
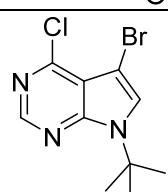


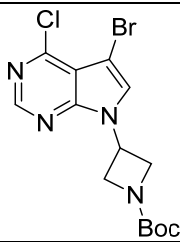
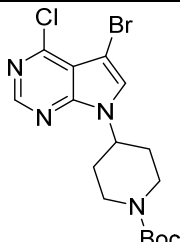
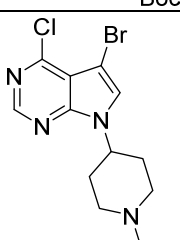
- 5 Una solución de 4-cloro-7-ciclopropil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (**C1**, 0.67g, 3.5 mmoles) en DCM (15 mL) se trató con NBS (0.74 g, 4.2 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se suspendió en agua (5 mL). Los sólidos se filtraron y se lavaron con agua (2 mL), se secaron al vacío para dar 5-bromo-4-cloro-7-ciclopropil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (0.6 g, 64%)
- 10 como un sólido blanco. ^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.69 (s, 1H), 8.00 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 1.10 (m, 4H); MS (ESI) m/z: 272.0 ($\text{M}+\text{H}^+$) y 274.

Utilizando el Método General D anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro D.

15

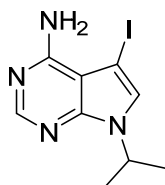
CUADRO D

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	^1H RMN (400 o 500 MHz, DMSO- d_6): δ	MS (m/z: $\text{M}+\text{H}^+$)
D2	C2		86	8.70 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 5.95 (m, 1H), 4.90-5.11 (m, 4H).	288.0 290.0
D3			65	Sin datos	288.0 290.0

D4	C3		87	8.68 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 5.58 (m, 1H), 4.33 (m, 4H), 1.43 (s, 9H).	387.0 389.0
D5	C4		93	8.67 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.12 (br m, 2H), 2.95 (br m, 2H), 1.85-2.10 (m, 4H), 1.44 (s, 9H).	415.0 417.0
D6	C5		76	Sin datos	329.0 331.0

Método General E: Sustitución

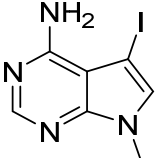
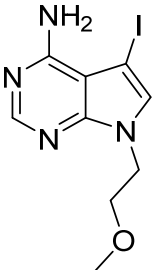
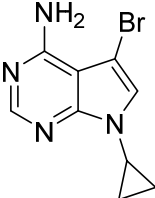
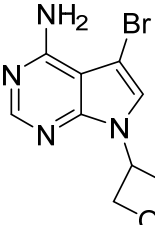
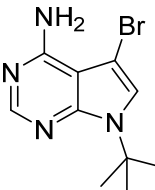
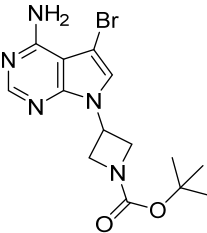
Ejemplo **E1**: 5-yodo-7-isopropil-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-amina

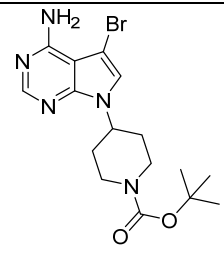
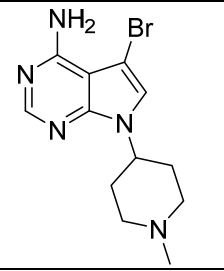
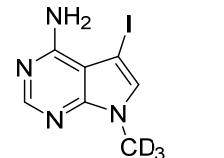
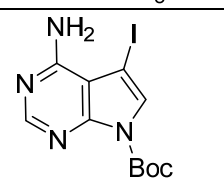
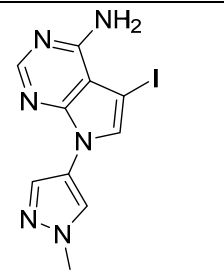
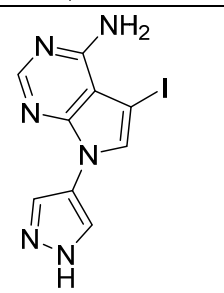


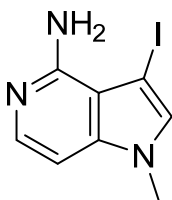
- 5 Una suspensión de 4-cloro-5-yodo-7-isopropil-7H-pirrólo[2,3-d]pirimidina (**B1**, 1.78 g, 5.5 mmoles) en 1,4-dioxano (5.5 mL) se trató con NH₄OH (30% en agua, 1.7 mL, 13 mmoles) y la reacción se calentó a 95 °C durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua fría. La mezcla se agitó a 0 °C durante 30 min y luego los sólidos se recolectaron mediante filtración al vacío para obtener el producto deseado 5-yodo-7-isopropil-7H-pirrólo[2,3-
- 10 d]pirimidin-4-amina (0.80 g, 48%) como un sólido color blanco. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.09 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.59 (s, 2H), 4.89 (m, 1H), 1.40 (d, J = 6.8 Hz, 6H); MS (ESI) m/z: 303.0 (M+H⁺).

Utilizando el Método General E anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro E.

CUADRO E

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
E2	B2		56	8.09 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.57 (br s, 2H), 3.66 (s, 3H).	274.78
E3	B3		71	8.10 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.26 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.64 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H).	319.0
E4	D1		97	8.17 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.78 (s, 2H), 3.56 (m, 1H), 1.05 (d, J = 6.7 Hz, 4H).	253.0 255.0
E5	D2		62	Sin datos	269.0 271.0
E6	D3		71	Sin datos	269.0 271.0
E7	D4		80	8.10 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 6.70 (br s, 2H), 5.43 (m, 1H), 4.16-4.38 (m, 4H), 1.42 (s, 9H).	368.2 370.2

E8	D5		87	8.10 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 6.72 (br s, 2H), 4.68 (m, 1H), 4.10 (br m, 2H), 2.91 (br m, 2H), 1.70-1.99 (m, 4H), 1.43 (s, 9H).	396.2 398.2
E9	D6		42	8.02 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.40 (m, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.89-2.01 (m, 4H), 1.65-1.82 (m, 2H).	310.0 312.0
E10	B4		90	8.10 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.62 (br s, 2H).	278.0
E11	B5		58	8.23 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.86 (br s, 2H), 1.60 (s, 9H).	360.8
E13	B6		23	8.32 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.74 (br s, 2H), 3.89 (s, 3H).	340.8
E14	B7		10	11.41 (br s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.04 (dd, J = 3.2, 2.4 Hz, 1H), 6.84 (br m, 3H), 7.04 (dd, J = 3.6, 2.0 Hz, 1H).	326.8

Preparación del Ejemplo **E12**: 3-yodo-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridin-4-amina

Una suspensión agitada de 3-yodo-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridina (0.90 g, 3.5 mmoles) en DCM (20 mL) se trató con ácido 3-cloroperoxibenzoico (0.90 g, 5.2 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción fue la mezcla de reacción que se extinguió con una solución saturada de NaHCO₃ y luego se extrajo con DCM (2x). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para dar el 5-óxido de 3-yodo-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridina crudo (0.6 g, 65%) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.12 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.59 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 275.0 (M+H⁺).

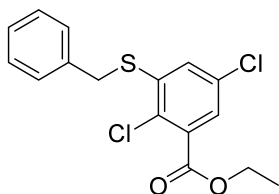
Una solución de 5-óxido de 3-yodo-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridina (0.6 g, 2.1 mmoles) en cloroformo (20 mL) se trató con (4-metoxifenil)metanamina (1.3 g, 9.8 mmoles) y se agitó durante aproximadamente 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a 0 °C seguido por la adición en porciones de cloruro de *p*-toluen sulfonilo (0.92 g, 4.8 mmoles) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h. La mezcla se diluyó con DCM (50 mL) y se lavó con solución saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (70% de EtOAc/hex) para dar el 3-yodo-N-(4-metoxibencil)-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridin-4-amina (0.2 g, 23%) como un sólido amarillo pálido. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.68 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.14 (br m, 1H), 4.64 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 394.2 (M+H⁺).

Una suspensión de 3-yodo-N-(4-metoxibencil)-1-metil-1H-pirrolo[3,2-c]piridin-4-amina (0.2 g, 0.508 mmoles) en DCM (10 mL) se agitó bajo un baño de agua helada. TFA (1 mL) se agregó gota a gota y luego la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se trató con solución saturada de NaHCO₃. La mezcla se agitó durante 10 min y la capa acuosa se extrajo además con 10% de MeOH/DCM (2x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (3 a 5% de MeOH/DCM) para dar 3-yodo-1-metil-1H-pirrolo [3,2-c]piridin-4-amina (0.05 g, 36%) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.63, d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.48

(s, 1H), 6.94 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.35 (br s, 2H), 3.72 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 273.9 (M+H⁺).

Método General F: Preparación de tio-éteres de aminas

Ejemplo F1: etil 3-(benciltio)-2,5-diclorobenzoato



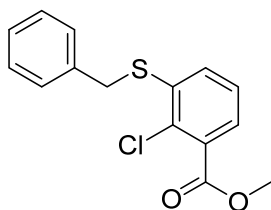
5

Una solución de etil 3-amino-2,5-diclorobenzoato (12.0 g, 51.0 mmoles) en CH₃CN (250 mL) se trató con nitrito de amilo (9.64 mL, 81.0 mmoles). Se agregó disulfuro de dibencilo (12.6 g, 51.0 mmoles) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se extinguió con agua helada (100 mL) y se extrajo con EtOAc (3x). Los orgánicos combinados se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El crudo se purificó por cromatografía de columna de gel de sílice (10 a 20% de EtOAc/hex) para dar etil 3-(benciltio)-2,5-diclorobenzoato (10.0 g, 58%) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.63 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H) 7.28 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.29 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

15

Método General G: Preparación de tio-éteres a partir de bromo.

Ejemplo F2: etil 3-(benciltio)-2-clorobenzoato



20

Una solución de metil 3-bromo-2-clorobenzoato (3.0 g, 12 mmoles), fenilmetanotiol (1.6 g, 13 mmoles) en tolueno (30 mL) se trató con DIEA (4.2 mL, 24 mmoles). La mezcla se purgó con Ar durante 5 min y luego se agregaron XantPhos (0.67 g, 1.2 mmoles) y Pd₂(dba)₃ (0.55 g, 0.60 mmoles). La mezcla se purgó con Ar durante 5 min y se calentó a 90 °C durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de gel de sílice, se lavó con EtOAc:hex (1:1). El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (0 al 100 % de EtOAc:hex) para obtener metil 3-(benciltio)-2-clorobenzoato (2.8 g, 80 %) como un aceite color naranja. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.60 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.37-7.46 (m, 2H), 7.31-7.37 (m, 2H), 7.23-7.31 (m, 2H),

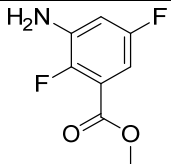
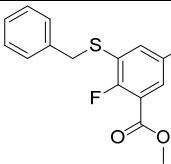
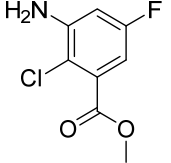
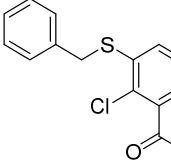
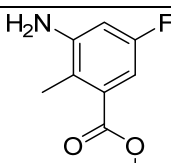
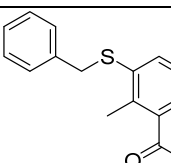
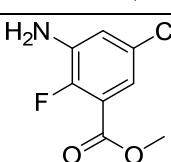
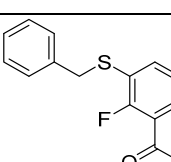
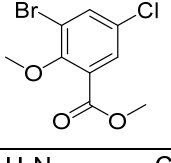
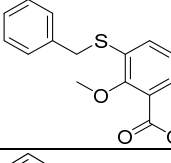
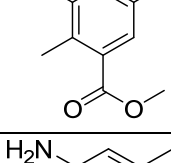
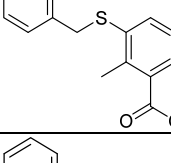
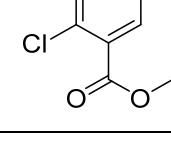
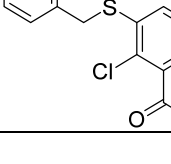
25

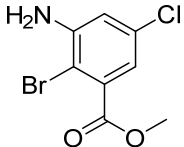
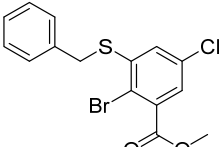
4.34 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).

Utilizando los Métodos Generales F y G anteriores, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro F.

5

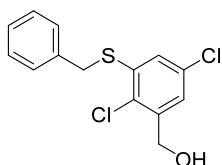
CUADRO F

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ
F3			41	7.59-7.72 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.20-7.26 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.77 (s, 3H).
F4			45	7.46-7.52 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 4H), 4.39 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).
F5			24	7.39 (m, 3H), 7.24-7.34 (m, 4H), 4.32 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).
F6			50	7.72 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.36 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.26 (m, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).
F7			74	7.55 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.24 (m, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.70 (s, 3H).
F8			42	7.54 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.26 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.35 (s, 3H).
F9			71	7.43 (m, 3H), 7.35 (m, 3H), 7.21 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.30 (s, 3H).

F10			60	7.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.26-7.45 (m, 5H), 4.41 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).
-----	---	---	----	--

Método General H: Reducción

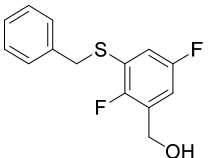
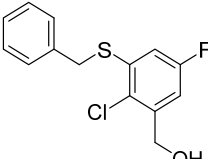
Ejemplo G1: (3-(benciltio)-2,5-diclorofenil)metanol



- 5 Una mezcla de CaCl_2 (0.45 g, 0.92 mmoles) y NaBH_4 (6.20 g, 37 mmoles) en EtOH (200 mL) se agitó a 0 °C. Una solución fría de etil 3-(benciltio)-2,5-diclorobenzoato (**F1**, 14.0 g, 9.2 mmoles) en THF (200 mL) se agregó gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C, se calentó lentamente a temperatura ambiente y luego se calentó a 60 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se extinguió con solución saturada de NH_4Cl (50 ml), y
- 10 luego se extrajo con EtOAc (3x). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron, y se concentraron bajo presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (1 a 10% de EtOAc/hex) para dar (3-(benciltio)-2,5-diclorofenil)metanol (8.0 g, 66%) como un sólido color marrón. ^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.44 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 7.25-7.32 (m, 2H), 5.57 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.36 (s,
- 15 2H).

Utilizando el Método General H anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro G.

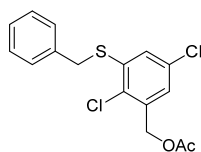
CUADRO G

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	^1H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d_6): δ
G2	F3		61	7.37 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.23 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 5.41 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H)
G3	F4		69	7.44 (m, 2H), 7.34-7.39 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 5.57 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H)

G4	F5		69	7.40 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.00 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).
G5	F6		76	7.36 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.23-7.29 (m, 3H), 5.15 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H).
G6	F7		98	7.36 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.26 (m, 3H), 5.28 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).
G7	F8		87	7.36 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.26 (m, 3H), 5.28 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).
G8	F9		97	7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.16 (s, 2H), 5.36 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.26 (s, 3H), 2.28 (s, 3H).
G9	F2		crudo	Sin datos
G10	F10		50	7.34-7.38 (m, 5H), 7.21 (br s, 1H), 7.14 (br s, 1H), 5.33 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H).

Método General I: Acetilación

Ejemplo **H1**: 3-(benciltio)-2,5-diclorobencil acetato



5

Una solución de (3-(benciltio)-2,5-diclorofenil)metanol (**G1**, 0.82 g, 2.7 mmoles) en THF (10 mL) se trató con anhídrido acético (0.31 mL, 3.3 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a 50 °C bajo Ar durante 2 h y luego se diluyó con agua. La solución se extrajo con EtOAc (3x) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se

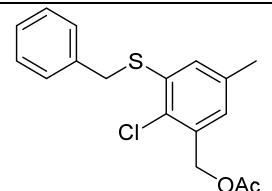
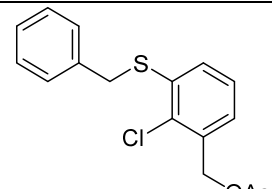
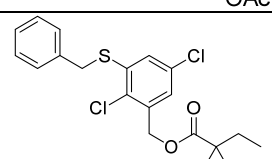
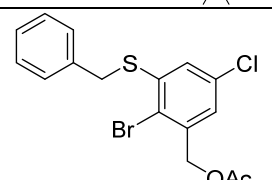
concentraron a presión reducida para obtener 3-(benciltio)-2,5-diclorobencil acetato (0.92 g, 98%) como un sólido color blanco. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.51 (m, 3H), 7.41 (m, 3H), 7.35 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 2.16 (s, 3H).

Utilizando el Método General I anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios

5 del Cuadro H.

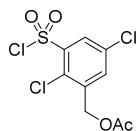
CUADRO H

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	^1H RMN (400 o 500 MHz, DMSO- d_6): δ
H2	G2		46	7.39 (m, 2H), 7.31 (m, 3H), 7.26 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 2.06 (s, 3H).
H3	G3		55	7.42 (m, 2H), 7.27-7.35 (m, 4H), 7.13 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 2.10 (s, 3H).
H4	G4		63	7.33-7.39 (m, 2H), 7.25-7.32 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.00 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).
H5	G5		70	7.48 (dd, J = 2.4 & 5.6 Hz, 1H), 7.38-7.29 (m, 5H), 7.27 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 2.06 (s, 3H).
H6	G6		99	7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.21 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).
H7	G7		94	7.38 (m, 3H), 7.31 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 5.06 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).

H8	G8		98	7.42 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).
H9	G9		94	Sin datos
H10	G1		75	7.30-7.46 (m, 7H), 5.10 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.08 (s, 6H), 0.77 (t, J = 5.2 Hz, 3H).
H11	G10		90	7.33-7.41 (m, 5H), 7.16-7.30 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 2.10 (s, 3H).

Método General J: preparación de cloruros de sulfonilo

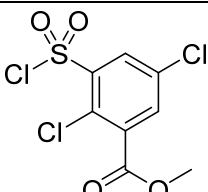
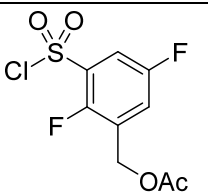
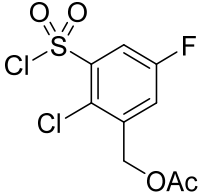
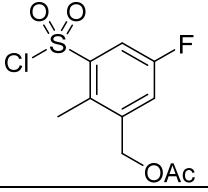
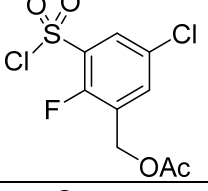
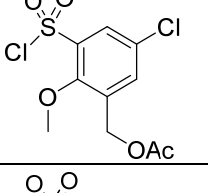
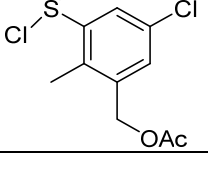
Ejemplo I1: 2,5-dicloro-3-(clorosulfonil)bencil acetato

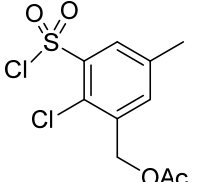
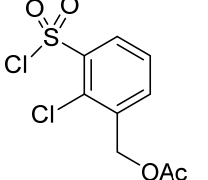
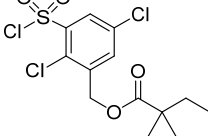
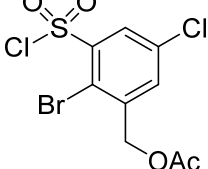


- 5 Una solución de 3-(benciltio)-2,5-diclorobencil acetato (**H1**, 0.92 g, 2.7 mmoles) y 1-cloropirrolidin-2,5-diona (1.8 g, 13 mmoles) en THF/H₂O (1:1, 3 mL) a 0 °C se trató con ácido acético (7 mL). La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y luego se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. La mezcla de reacción se extinguió con solución saturada de NaHCO₃ (100 mL) y se extrajo con EtOAc (3x). Los orgánicos combinados se secaron sobre
- 10 Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El crudo se purificó mediante cromatografía de columna de gel de sílice (0 a 100% de EtOAc/hex) para dar 2,5-dicloro-3-(clorosulfonil)bencil acetato (0.45 g, 53%) como un sólido color blanco. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.84 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.11 (s, 3H).

- 15 Utilizando el Método General J anterior, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro I.

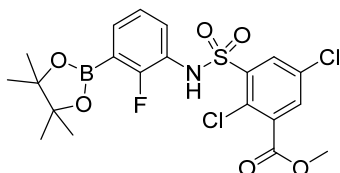
CUADRO I

Ej No	SM	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ
I2			53	7.99 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 4H).
I3	H2		59	7.35 (m, 1H), 7.27 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.08 (s, 3H).
I4	H3		57	7.61 (dd, J = 8.4, 3.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.8, 3.2 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).
I5	H4		72	7.49 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.08 (s, 3H).
I6	H5		84	7.60 (dd, J = 5.6, 2.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 5.6, 2.8 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.07 (s, 3H).
I7	H6		47	Sin datos
I8	H7		41	7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

I9	H8		37	7.70 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 (s, 3H).
I10	H9		92	7.88 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 2.09 (s, 3H).
I11	H10		80	7.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.05 (s, 6H), 0.83 (t, J = 5.2 Hz, 3H).
I12	H11		32	7.88 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 2.14 (s, 3H).

Método General K: Acoplamiento de sulfonamida

Ejemplo **J1**: metil 2,5-dicloro-3-(N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)sulfamoil)benzoato



5

Una solución de 2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)anilina (**A12.2** g, 9.3 mmoles) en DCM (30 mL) se trató con piridina (2.2 mL, 28 mmoles). La mezcla se reacción se enfrió a 0 °C y una solución de metil 2,5-dicloro-3-(clorosulfonil)benzoato (**I22.8** g, 9.3 mmoles) en DCM (10 mL) se agregó gota a gota. La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida, y el crudo se disolvió en DCM (50 mL). La solución se lavó con 1.0 M HCl (2x), NaHCO₃ acuoso (3x) y salmuera (1x). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se suspendió en hex y los sólidos se recolectaron por medio de filtración al vacío para obtener metil 2,5-dicloro-3-(N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)sulfamoil)benzoato (4.2 g, 90%) como un sólido color marrón. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.71 (s, 1H), 8.13 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.38 (td, J = 7.9,

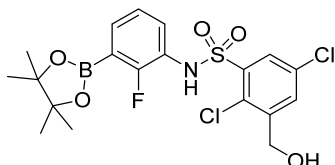
10

15

1.8 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 1.28 (s, 12H); MS (ESI) m/z 526.0 (M+Na+H⁺).

Método General L: Reducción

Preparación del Ejemplo **J2**: 2,5-dicloro-N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)-3-(hidroximetil)bencensulfonamida

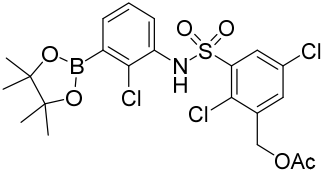
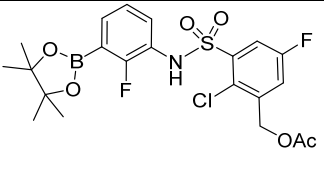
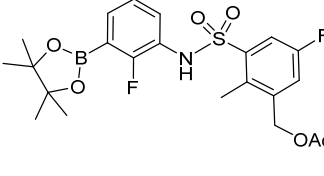
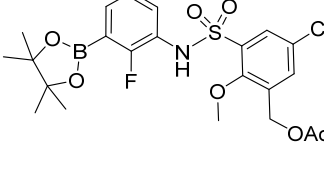
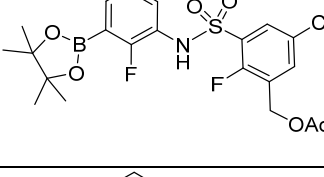
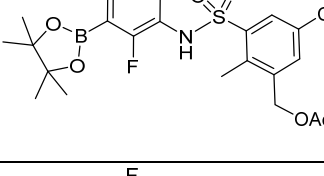
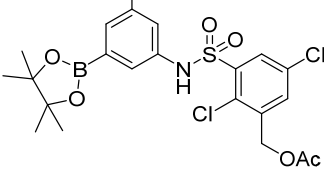
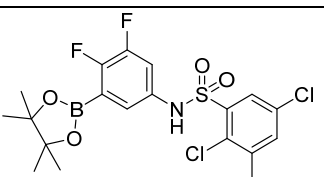


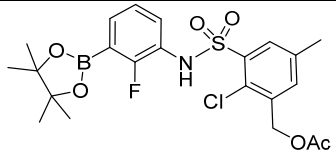
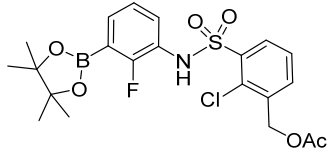
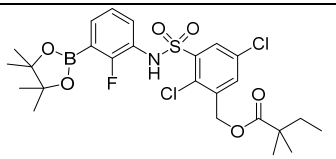
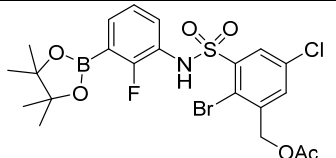
Una solución de metil 2,5-dicloro-3-(N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)sulfamoil)benzoato (**J1**, 0.5 g, 0.99 mmoles) en THF (5 mL) se trató con LAH (0.11 g, 30 mmoles) en porciones a 0 °C y luego se agitó a 0 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con éter dietílico y luego se extinguió con agua (0.2 mL), 15% de NaOH acuoso (0.2 mL) y agua (0.4 mL). La mezcla se agitó durante 4 h y luego se filtró a través de una almohadilla de celite. El filtrado se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener 2,5-dicloro-N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)-3-(hidroximetil)bencensulfonamida (0.26 g, 55%) como sólido incoloro que se usó para la siguiente reacción sin purificación adicional. MS (ESI) m/z 498.0 (M+Na+H⁺).

Utilizando los Métodos Generales K y L anteriores, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro J.

CUADRO J

Ej. No.	SM	Producto	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
J3	A1 I1		77	10.64 (br s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.12 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.26 (s, 12H).	516.0 (negativo)
J4	A3 I1		crudo	Sin datos	452 (negativo) masa de ácido borónico

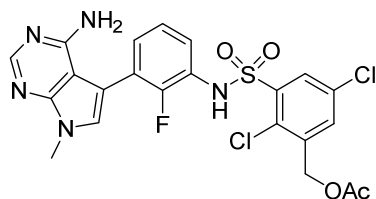
J5	A5 I1		crudo	10.50 (br s, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 6.4, 2.8 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).	Sin datos
J6	A1 I4		86	10.61 (br s, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.55 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.22 (s, 12H)	
J7	A1 I5		crudo	Sin datos	Sin datos
J8	A1 I7		98	10.15 (br s, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.64 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.27 (s, 12H)	512.2
J9	A1 I6		60	7.88 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.45-7.51 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.26 (s, 12H). Falta NH	Sin datos
J10	A1 I8		crudo	10.49 (br s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.33-7.42 (m, 2H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.26 (s, 12H).	
J11	A2 I1		crudo	Sin datos	434.2 ácido borónico
J12	A4 I1		crudo	Sin datos	452.2 ácido borónico

J13	A1 I9		crudo	Sin datos	414.0 ácido borónico
J14	A1 I10		crudo	Sin datos	424.0 ácido borónico+N a
J15	A1 I11		50	10.15 (br s, 1H), 7.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.07-7.11 (br m, 1H), 6.73-6.76 (br m, 1H), 5.19 (s, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.27 (s, 12H), 1.13 (s, 6H), 0.76 (t, J = 4.4 Hz, 3H).	572.0 (negativo)
J16	A1 I12		60	10.59 (br s, 1H), 8.82 (m, 2H), 8.32 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.82-8.03 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.27 (s, 12H).	561.9

Método General M: Reacción de Suzuki

Ejemplo 1: 3-(N-(3-(4-amino-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-

5 fluorofenil)sulfamoil)-2,5-diclorobencil acetato

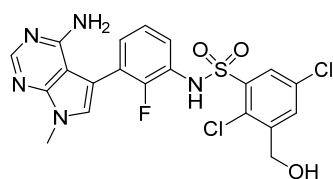


Una solución de 5-yodo-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (1.7 g, 6.3 mmoles) en una mezcla de 1,4-dioxano y agua (4:1, 100 mL) se agitó bajo Ar. 2,5-Dicloro-3-(N-(2-fluoro-3-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)sulfamoil)bencil acetato (3.6 g, 6.9 mmoles) y Cs₂CO₃ (5.1 g, 15.7 mmoles) se agregó a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se desgasificó con Ar durante 5 min. Pd(dppf)Cl₂.DCM (0.25 g, 0.31 mmoles) se agregó y la solución resultante se calentó a 90 °C durante 1.5 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de celite, se lavó con EtOAc. El filtrado se lavó con NaHCO₃ saturado (2x), seguido por agua (2x). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para obtener el material crudo. El material crudo se agitó además

en CH₃CN (300 mL) a temperatura ambiente durante 2 h. Los sólidos se filtraron y se secaron bajo vacío para dar 3-(N-(3-(4-amino-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-fluorofenil)sulfamoil)-2,5-diclorobencil acetato (2.5 g, 91%) como un sólido de color marrón claro. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.76 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.19 (m, 3H), 6.02 (br s, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.56 (s, 3H); MS (ESI) m/z 538.0 (M+H⁺).

Método General N: Desprotección

Ejemplo 2: N-(3-(4-amino-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-fluorofenil)-2,5-dicloro-3-(hidroximetil)bencensulfonamida



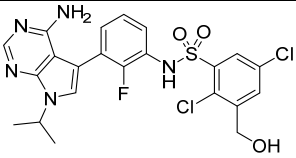
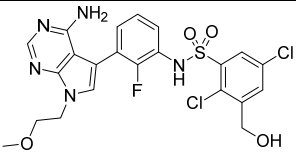
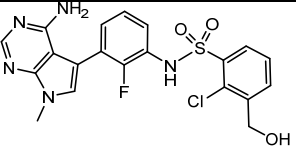
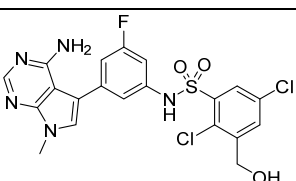
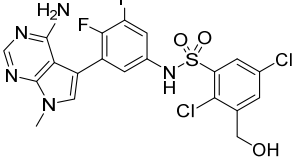
10

Una solución de 3-(N-(3-(4-amino-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-fluorofenil)sulfamoil)-2,5-diclorobencil acetato (**1**, 2.3 g, 4.2 mmoles) en MeOH (40 mL) se trató con K₂CO₃ (2.3 g, 17 mmoles) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, y luego el solvente se evaporó bajo presión reducida. El material crudo se acidificó con una solución de ácido cítrico al 10% (pH~5) y luego el sólido se filtró y se lavó a fondo con agua. El sólido se trató con una mezcla de CH₃CN (5 mL) y DCM (5 mL) a temperatura ambiente durante 2 h. Los precipitados se filtraron y se secaron para obtener N-(3-(4-amino-7-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-5-il)-2-fluorofenil)-2,5-dicloro-3-(hidroximetil) bencensulfonamida (1.6 g, 76%) como un sólido blanquecino. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (br m, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.15-7.25 (br m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H). MS (ESI) m/z 496.27 (M+H⁺).

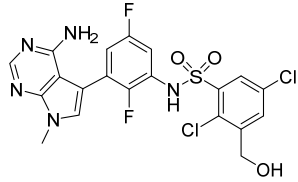
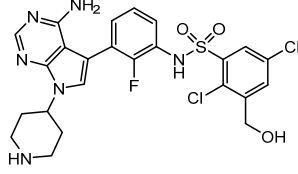
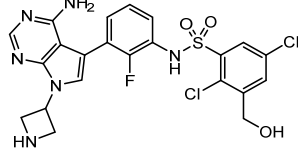
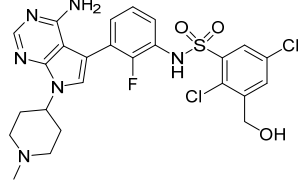
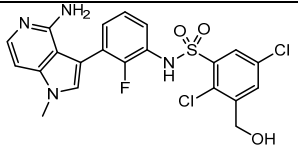
20

Utilizando los Métodos Generales L, M y N anteriores, se prepararon los siguientes Intermediarios del Cuadro K.

CUADRO K

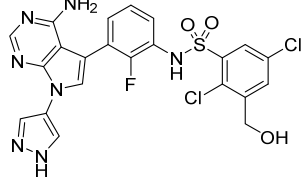
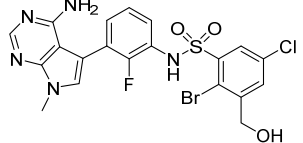
Ej. No	SM	Producto	Método	Rendimiento (%)	¹ H RMN (400 o 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
3	E1 J2		M	13	10.73 (s, 1H), 8.13 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.14-7.27 (m, 3H), 6.00 (s, 2H), 5.75 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.61 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 1.44 (d, J = 6.7 Hz, 6H).	524.0
4	E3 J1		M & L	15	10.75 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 (m, 3H), 6.06 (s, 2H), 5.76 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.33 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H).	540.0
5	E2 J14		M & N	6	¹ H RMN (500 MHz, DMSO) ? 10.60 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.88 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.74 – 7.62 (m, 1H), 7.49 – 7.39 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.13 – 7.09 (m, 1H), 7.05 – 6.92 (m, 2H), 5.99 (br s, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.59 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H).	462.0
6	E2 J11		M & N	10	11.26 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.05 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.20-7.43 (br s, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.94 (br d, J = 9.6, 1H), 6.88 (br d, J = 10.9 Hz, 1H), 5.72 (br s, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.79 (s, 3H).	496.2
7	E2 J12		M & N	10	10.77 (br s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.92 (br m, 1H), 5.90 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.61 (d, J	514.1

					= 4.8 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H). a alta temperatura	
8	E4 J1		M & L	14	10.64 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.13 (d, J = 2.8 Hz, 4H), 5.92 (s, 2H), 5.67 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.50 (m, 1H), 1.0 (m, 4H).	522.0
9	E5 J3		M	21	10.80 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.96 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.30 (td, J = 6.3, 3.5 Hz, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.10 (s, 2H), 5.86 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 4.99 (m, 4H), 2.09 (s, 3H).	580.0
10	9		N	20	10.75 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.11 (s, 2H), 5.86 (tt, J = 7.7, 6.7 Hz, 1H), 5.75 (m, 1H), 4.99 (p, J = 6.9 Hz, 4H), 4.62 (d, J = 5.5 Hz, 2H).	538.0
11	 J1		M & L	22	10.86 (s, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), 7.29 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.27 – 7.24 (m, 2H), 5.72 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.60 (d, J = 4.8 Hz, 2H).	499.0
12	 J1		M & L	32	10.84 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 2H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.21 (m, 3H), 6.96 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 5.72 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.61 (d, J = 5.4 Hz, 2H).	483.0
13	E6 J1		M & L	15	10.62 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.13 (m, 4H), 5.85 (s, 2H), 5.66 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 5.6	538.0

					Hz, 2H), 1.65 (s, 9H).	
14	E2 J4		M & N	10	11.03 (br s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.98-7.07 (m, 2H), 6.21 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	514.2
15	E8 J3		M & N	23	8.62 (s, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.99 (m, 2H), 6.85 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.57 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 5.53 (s, 1H), 4.80 (tt, J = 11.9, 4.2 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.05 (td, J = 12.9, 3.1 Hz, 2H), 2.11 (tt, J = 12.8, 6.6 Hz, 2H), 2.03 (dd, J = 13.5, 3.6 Hz, 2H).	565.0
16	E7 J3		M & N	9	8.10 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.80 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.03 (td, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 6.88 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.54 (p, J = 7.9 Hz, 1H), 4.46-4.53 (m, 5H), 4.32 (m, 2H). Faltan 3Hs	537.0
17	E9 J3		M & N	25	8.14 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.15 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.00 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 5.69 (s, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.11 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.43-2.50 (m, 3H), 2.15 (m, 2H), 1.94-2.04 (m, 2H).	580.0
18	E12 J3		M & N	14	10.5 (br s, 1H), 7.86 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.04 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.91 (br m, 1H), 5.81 (br s, 2H), 5.65 (t, J = 5.9 Hz, 1H),	495.3

					4.58 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H)	
19	E2 J6		M & N	35	10.7 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 8.0, 3.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.18-7.20 (m, 3H), 6.00 (br s, 2H), 5.73 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	480.3
20	E2 J5		M & N	8	10.5 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.79 (br m, 2H), 7.35 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.22 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 5.84 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	512.3
21	 J3		M & N	25	10.74 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.19 (s, 2H), 5.68 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H). Faltan 2Hs	497.0
22	E2 J9		M & N	25	10.72 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.75 (br m, 1H), 7.61-7.67 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.18-7.25 (br m, 3H), 5.98 (br s, 2H), 5.93 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	480.0
23	E2 J7		M & N	9	10.51 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.44-7.52 (br m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.16 (br m, 3H), 5.97 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.45 (s, 3H).	460.0
24	E2 J8		M & N	54	10.24 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.69 (br s, 1H), 7.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.10-7.24 (m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.51 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H).	492.1

25	E2 J13		M & N	78	10.40 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.71 (br s, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.18 (br m, 3H), 5.96 (br s, 2H), 5.54 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)	476.2
26	E2 J10		M & N	36	10.52 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.72 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.68 (br d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.19 (br m, 3H), 5.97 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H). 3Hs están bajo solventes	476.3
27	E10 J3		M & N	19	10.68 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.12-7.21 (m, 3H), 5.99 (s, 2H), 5.71 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.5 Hz, 2H).	499.0
28	A1E11 y luego I1		M & K	crudo	Sin datos	623.9
29	2		POCl3 NaOMe	45	10.72 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.88 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.20 (m, 3H), 6.00 (br s, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.38 (s, 3H).	510.0
30	E2 J15		M	26	10.74 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.19 (m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.19 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.45 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.06 (s, 6H), 0.70 (t, J = 7.6 Hz, 3H).	594.1
31	E13 J3		M & N	26	10.74 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.77 (br s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.22 (br m, 3H), 6.12 (br s, 2H),	562.2

					5.72 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H).	
32	E14 J3		M & N	8	13.06 (br s, 1H), 10.74 (br s, 1H), 8.35 (br m, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (br m, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.76 (br s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.22 (br m, 3H), 6.11 (br s, 2H), 5.71 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H).	548.1
33	E2 J16		M & N	12	10.65 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.17-7.22 (m, 3H), 6.01 (br s, 2H), 5.77 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	540.2

EJEMPLO 30

Ensayo bioquímico para GCN2

- 5 La actividad de la GCN2 quinasa se determinó mediante un ensayo de actividad de la TR-FRET quinasa (e.g. Riddle *et al.* Analytical Biochemistry (2006) 356(1) 108-116). Los análisis se llevaron a cabo en placas de 384 pozos (volumen de ensayo de 13 μ L) utilizando GCN2 2 nM (Carna Biosciences), GFP-EIf2 α 130 nM (Invitrogen), 0.2 mg/ml de ARNt de *E. coli* (sigma) y ATP 1 mM en regulador de pH de quinasa (Invitrogen). La inhibición de GCN2 se midió al agregar el compuesto de
- 10 prueba diluido en serie (concentración final del ensayo de 0.5% de DMSO) seguido por incubación de 3-horas. Anticuerpo Tb-peIF2 α (pSer52) (Invitrogen) (concentración de ensayo final de 2 nM) en regulador de pH de quinasa que contiene EDTA (concentración final del ensayo de 20 mM) se agregó. Después de incubación durante 60 min a temperatura ambiente, TR-FRET se monitoreó utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm y longitudes de onda de emisión de 490 nm
- 15 y 520 nm. La relación de emisión (520/490) en cada concentración del compuesto se convirtió en porcentaje de inhibición usando controles (es decir, reacción sin compuesto de prueba y reacción con un inhibidor conocido) y los valores de CI₅₀ se calcularon ajustando una curva sigmoideal de cuatro parámetros a los datos usando Prism (software GraphPad).
- 20 SEQ ID NO: 1 - secuencia de proteína GCN2 (residuos 1-1649; G556E con una etiqueta GST N-terminal)

MAPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIA
 DKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHP
 DFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLQ
 GPLGAMGSGIQRPTSTSSVMAGGRGAPGRGRDEPPESYPQRQDHELQALEAIYGADFQDLRPDACGPVKEPPE
 5 INLVLPQGLTGEEVYKVDLRVKCPPTYPDVVPEIELKNAKGLSNESVNLLKSRLEELAKKHCGEVMIFELAYHVQ
 SFLSEHNKPPPKSFHEEMLERRAQEEQQRILLEAKRKEEQEQREILHEIQRRKEEIKEEKKRKEMAKQERLEIASLS
 NQDHTSKKDPGGHRTAAILHGGSPDFVGNKGHRANSSGRSRRERQYSVCNSEDSPGSCEILYFNMGSPDQLMV
 HKGKCIGDEQLGKLVYNALETATGGFVLLYEWVLQWQKKMGPFLLTSQEKEKIDKCKKQIQGTETEFNSLVKLSHP
 NVVRYLAMNLKEQDDSIIVDILVEHISGVSLAAHLSHSGPIPVHQLRRYTAQLLSGLDYLSNSVHVHKLVSASNVL
 10 VDAEGTVKITDYSISKRLADICKEDVFEQTRVRFSDNALPYKTGKKGDVWRLGLLLLSLSQGQECGEYPVTIPSDL
 PADFQDFLKKCVCLDDKERWSPQQLLKHSFINPQPKMPLVEQSPEDSGGQDYVETVIPSNRLPAAFFSETQRQF
 SRYFIEFEELQLLGKGAFGAVIKVQNKLDGCCYAVKRIPINPASRQFRRIKGEVTLLSRLHHENIVRYYNWIERHE
 RPAGPGTPPPDSGPLAKDDRAARGQPASDTDGLDSVEAAAPPPILSSSVIEWSTSGERSASARFPATGPGSSDDE
 DDEDEHGGVFSQSFLPASDESDDIIFDNEDENSKSQNQDEDCNEKNGCHESEPSVTTEAVHYLYIQMEYCEKS
 15 TLRDTIDQGLYRDTVRLWRLFREILDGLAYIHEKGMIHRLKPVNIFLDSDDHVKIGDFGLATDHLAFSADSKQD
 DQTGDLIKSDPSGHLTGVMGTALYVSPEVQGSTKSAYNQKVDLFSLGIIFFEMSYHPMVTASERIFVLNQLRDPT
 SPKFPEDFDDGEHAKQKSVISWLLNHDPKRPTATELLKSELLPPPQMEESLHEVLHHTLTNVDGKAYRTMMA
 QIFSQRISPAIDYTYDSDILKGNFSIRTAKMQQHVCETIIRIFKRHGAVQLCTPLLPNRNRIYEHNEAALFMDHSG
 MLVMLPFDLRIPFARYVARNNILNLKRYCIERVFRPRKLDRFHPKELLECAFDIVTSTTNSFLPTAEIITYIIEIIEF
 20 PALQERNYSIYLNHTMLLKAILLHCGIPEDKLSQVYIILYDAVTEKLTRREVEAKFCNLSSNSLCRLYKFIEQKGD
 LQDLMPTINSLIKQKTGIAQLVKYGLKDLEEVGLLKKLGKILQVLINLGLVYKVQQHNGIIFQVAFIKRRQRAVP
 EILAAGGRYDLLIPQFRGPQALGPVPTAIGVSIAIDKISAAVLNMEESVTISSCDLLVSVGQMSMSRAINLTQKLW
 TAGITAEIMYDWSQSQEELQEYCRHHEITYVALVSDKEGSHVKVSFEKERQTEKRVLETTELVDHVLQKLRTKVT
 DERNGREASDNLAVQNLKGSFSNASGLFEIHGATVPVIVSVLAPEKLSASTRRRYETQVQTRLQTSANLHQKSS
 25 EIEILAVDLPKETILQFLSLEWDADEQAFNTTVKQLLSRLPKQRYLKLVCDEIYNIKVEKKVSVLFLYSYRDDYYRIL
 F

EJEMPLO 31

Ensayo bioquímico para PERK

30

La actividad de la PERK quinasa se determinó espectroscópicamente usando un
 ensayo acoplado de piruvato quinasa/lactato deshidrogenasa que monitorea continuamente la
 oxidación de ATP dependiente de la hidrólisis de NADH (por ejemplo, Schindler *et al.* Science (2000)
 289: 1938-1942). Los ensayos se realizaron en placas de 384 pozos (volumen final de 100 μ L)
 35 utilizando 10 nM de PERK (de Beryllium), 0.25 mg/mL de sustrato de proteína básica de mielina,

1.5 unidades de piruvato quinasa, 2.1 unidades de lactato deshidrogenasa, piruvato de fosfoenol 1 mM, NADH 0.28 mM y ATP 1 mM en regulador de pH de ensayo (Tris 100 mM, pH 7.5, MgCl₂ 15 mM, DTT 0.5 mM, 0.004 % (p /v) BSA, y 0.004% de Triton X-100). La inhibición de PERK se midió al agregar el compuesto de prueba diluido en serie (concentración final del ensayo de 1% de DMSO). Una disminución en la absorción a 340 nm se monitoreó continuamente durante 6 horas a 30 °C en un lector de microplacas multimodo (BioTek). La velocidad de la reacción se calculó utilizando el marco de tiempo de 2-3 h. La velocidad de la reacción en cada concentración del compuesto se convirtió en porcentaje de inhibición usando controles (es decir, reacción sin compuesto de prueba y reacción con un inhibidor conocido) y los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando rutinas de software en Prism (software GraphPad).

SEQ ID NO: 2 - secuencia de proteína de PERK (residuos 563-1115; Secuencia ID: NM 004836)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIA
 DKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHP
 15 DFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGS
 KYDSVSGEANDSSWNDIKNSGYISRYLTDFEPIQCLGRGGFGVVFEAKNKVDDCNYAIAKRIRLPNRELAREKVMR
 EVKALAKLEHPGIVRYFNAWLEAPPEKWQEKMDIWLKDESTDWPLSSPSPMDAPSVKIRRMDPFSTKEHIEIIA
 PSPQRSRSFSVGISCDQTSSSESQFSPLEFSGMDHEDISESVDAAYNLQDSCLTDCDVEDGTMDGNDEGHSFEL
 CPSEASPYVRSRERTSSSIVFEDSGCDNASSKEEPKTNRHLIGNHCANKLTAFKPTSSKSSSEATLSISPPRPTTSL
 20 DLTKNTEKLPSPSPKVYLYIQMQLCRKENLKDWMNGRCTIEERERSVCLHIFLQIAEAVEFLHSKGLMHRDLKP
 SNIFFTMDDVVKVGDFGLVTAMDQDEEEQTVLTPMPAYARHTGQVGTKLYMSPEQIHGNSYSHKVDIFSLGLILF
 ELLYPFSTQMERVRTLT DVRNLKFPPLFTQKYPCEYVMVQDMLSPSPMERPEAINIENAVFEDLDFPGKTVLRQR
 SRSLSSTGKHSRQSNNSHSPLPSN

CUADRO 1**Inhibición de la actividad bioquímica de GCN2 y PERK quinasas por medio de compuestos ejemplares**

No. de ejemplo	GCN2 CI ₅₀ (nM)	PERK CI ₅₀ (nM)
1	++++	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	++++	+
6	++	+
7	++	+
8	+	+
9	++++	+
10	+	+
11	++	+
12	++	+
13	++	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	++++	+
19	++	+
20	++	+
21	+	+
22	++	+
23	++	+
24	++++	+
25	++	+
26	+	+
27	+	+
29	++	+
30	++++	++++
31	+	+
32	+	+
33	+	+

Para el Cuadro 1, "+" se refiere a una CI₅₀ menor o igual a 100 nM; "++" se refiere a una CI₅₀ superior a 100 nM e inferior o igual a 500 nM; "++++" se refiere a una CI₅₀ superior a 500 nM e inferior o igual a 1000 nM; y "+++++" se refiere a una CI₅₀ superior a 1000 nM e inferior o igual a 10000 nM.

En los siguientes ejemplos y figuras proporcionados en la presente, "Compuesto 2" se refiere al compuesto del Ejemplo 2 como se describe anteriormente.

EJEMPLO 32**Ensayo de proliferación celular CCRF-CEM ASNasa un ensayo fenotípico para inhibición celular de GCN2**

5 Las células de leucemia CCRF-CEM (catálogo #CCL-116) se obtuvieron del American Type Culture Collect (ATTC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar un millón de células por mL momento en el que se subcultivan o recolectan para su uso en ensayos. Diez mil células por pozo en 200 µL de RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor y 1 % de Penicilina/Estreptomicina se dispensaron en una placa de fondo transparente negra de 96 pozos. Se agregó una dilución en serie del compuesto de prueba y 1 mU/mL de ASNasa por triplicado y las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al final de la incubación, 40 µL de una solución 440 mM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS se agregó a cada pozo de la placa y las placas se incubaron durante 6 h adicionales a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las placas se leyeron en un lector Synergy2 o lector equivalente (Biotek, Winooski VT) utilizando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI₅₀.

20

EJEMPLO 33**Ensayo de FosFo-GCN2 y ATF4 de HCT116 privado de aminoácido (-AA)**

25 Las células de cáncer colorrectal HCT116 (catálogo #CCL-247) se obtuvieron del American Type Culture Collect (ATTC, Manassas, VA). En resumen, las células se hicieron crecer en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar una confluencia del 70-95 %, momento en el que se subcultivaron o recolectaron para su uso en ensayos. Las células se sembraron en una placa de cultivo de 12 pozos a quinientas mil células por pozo en 1 mL de medio de crecimiento completo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al día siguiente, cada pozo se reemplazó con 1 mL de solución salina equilibrada de Earle (EBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementada con suero bovino fetal dializado al 10 %, glucosa 5.5 mM, penicilina/estreptomicina al 1 % y solución de vitamina al 1 % (thermo #11120052). Una dilución en serie del compuesto de prueba se dispensó en el pozo. Las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de

35

humedad. Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS suplementado con inhibidor de proteasa Halt 1X, inhibidor de fosfatasa Halt 1X, cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa Sigma 1X y EDTA 1X y luego se lisaron con reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER suplementado con 3X de la mezcla del inhibidor como se describió arriba. Los lisados celulares se sonicaron con sonificador en baño de agua (Qsonica, Newtown, CT) y los sobrenadantes se hirvieron con regulador de pH de SDS y agente de reducción. Se realizó Western blot en cada lisado para cuantificar fosfo-GCN2 (Thr899), GCN2 total, ATF4 y beta-Actina. Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE). Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI_{50} .

10

EJEMPLO 34

CCRF-CEM TG ATF4 ELISA, un ensayo fenotípico para la inhibición celular de PERK preactivada por tapsigargina (TG)

15 Las células de leucemia CCRF-CEM (catálogo #CCL-116) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA). Brevemente, las células se hicieron crecer en medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar un millón de células por mL momento en el que se subcultivan o recolectan para su uso en ensayos. Un millón quinientas mil células por pozo en 1 mL de medio de crecimiento completo se dispensaron en placas de 12 pozos y se incubaron durante la noche. Una dilución en serie del compuesto de prueba se agregó y las células se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% durante tres horas, luego se agregó 1 µM de tapsigargina y las células se incubaron durante una hora más a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95%. Las células se lisaron luego los niveles de ATF4 se midieron utilizando un ensayo de ELISA (Proteintech, Rosemont, IL). La absorbancia se midió a 450 nM y 544 nM utilizando un lector Synergy2 o equivalente (Biotek, Winooski VT). Los datos se analizaron utilizando el software PRISM (GraphPad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI_{50} .

20

25

CUADRO 2

Inhibición de la proliferación de células CCRF-CEM tratadas con ASNasa, Fosfo-GCN2 y ATF4 en HCT116 privado de aminoácidos, y ATF4 en células CCRF-CEM estimuladas con Tapsigargina mediante compuestos ejemplares

No. de ejemplo	Proliferación de células CCRF-CEM ASNasa	Western Blot HCT116-AA pGCN2	Western Blot HCT116-AA ATF4	CCRF-CEM Tapsigargina ATF4 ELISA
1	++			++
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+			+
5	++++			++
6	+++			++
7	+++			++
8	+			+
9	++			+
10	+			+
11	+++			++++
12	++++			++++
13	++			++
14	++			++
15	++			+++
16	+++			++
17	+			+
18	++++			++++
19	++			+
20	++			++
21	++			++
22	++++			++
23	+++			++
24	++++			++
25	++			+
26	++			+
27	+			+
29	++++			++
30	++++			+++
31	+			+
32	+			++
33	+			+

5

Para el Cuadro 2, "+" se refiere a una CI_{50} menor o igual a 100 nM; "++" se refiere

a una CI_{50} superior a 100 nM e inferior o igual a 500 nM; “+++” se refiere a una CI_{50} superior a 500 nM e inferior o igual a 1000 nM; y “++++” se refiere a una CI_{50} superior a 1000 nM e inferior o igual a 10000 nM.

5

EJEMPLO 35**ENSAYO ELISA H929 ATF4**

Las células de mieloma múltiple H929 (catálogo #CRL-9068) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA). En resumen, las células se hicieron crecer en un medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero de bovino fetal inactivado con calor (catálogo #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% de Penicilina / Estreptomina / L-Glutamina (catálogo #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol (catálogo #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar un millón quinientas mil células por mL momento en el que se subcultivan o recolectan para su uso en ensayos. Un millón quinientas mil células por pozo en 1 mL de medio de crecimiento completo se dispensaron en placas de 12 pozos y se incubaron durante la noche. Una dilución en serie del compuesto de prueba se agregó y las células se incubaron a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% durante cuatro horas. Las células se lisaron luego los niveles de ATF4 se midieron utilizando un ensayo de ELISA (Proteintech, Rosemont, IL). La absorbancia se midió a 450 nM y 544 nM utilizando un lector Synergy2 o equivalente (Biotek, Winooski VT). Los datos se analizaron utilizando el software PRISM (Graphpad, San Diego, CA) para calcular la cantidad de estimulación de ATF4 celular con relación al control tratado con vehículo.

CUADRO 3**Estimulación de ATF4 en células de mieloma múltiple H929 por compuestos ejemplares**

No. de ejemplo	H929 NS ATF4 ELISA
1	++++
2	+++
3	++++
4	+++
5	++
8	+++
9	++++
10	+++
14	++
17	+++
21	++
24	++
25	+++
26	+++

Para el Cuadro 3, "+" se refiere a un estímulo ATF4 menor o igual a 5 veces; "++" se refiere a un estímulo ATF4 superior a 5 veces y menor o igual a 10 veces; "+++" se refiere a un estímulo ATF4 superior a 10 veces y menor o igual a 20 veces.

La figura 1 es una representación gráfica que demuestra la estimulación no esperada del marcador UPR/ISR ATF4 (barras de color negro) en respuesta a las concentraciones incrementadas del Compuesto 2. La estimulación se produjo en forma de campana en la que se encontró que los niveles de ATF4 alcanzaban su punto máximo en concentraciones que oscilaban entre 4 y 123 nM, la escala de concentración en el que el Compuesto 2 ocupaba el 50 % o menos de las moléculas de PERK, seguido de una fase inhibidora en la que se revertía la expresión de ATF4 a niveles basales en concentraciones superiores o equivalentes a 370 nM del Compuesto 2. La estimulación máxima en la señal ATF4 fue 13 veces mayor y se produjo alrededor de 41 nM del Compuesto 2.

EJEMPLO 36**Detección de oligomerización PERK usando NanoBRET**

Las construcciones para BRET se construyeron utilizando el sistema de inicio NanoBRET™ Flexi® PPI (Promega, Madison, WI). La PERK ORF de longitud completa se obtuvo de Genscript (Piscataway, NJ). Las células de HEK-293 (catálogo #CRL-1573) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en medio

MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Para los ensayos BRET, las células se sembraron a una densidad de 40,000 células/mL en medio de cultivo en placas de 6 pozos y se les permitió adherirse y recuperarse. Las células se transfectaron con PERK-NLuc marcado en C-terminal y PERK-Halo marcado en C-terminal usando Lipofectamina LTX (Thermo, Waltham, MA) y se les permitió expresar proteínas durante la noche a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. A continuación, las células se separaron de las placas de cultivo utilizando tripsina-EDTA al 0.05 %, se recolectaron y se diluyeron en medio de ensayo que consistía en medio de suero reducido Opti-MEM® I suplementado con FBS al 4 % (Thermo) para 22,000 células/mL. Las células se dispensaron en placas de cultivo celular de 96 pozos y Ligando HaloTag® NanoBRET™ 618 (Promega) se agregó a una concentración final de 100 nM. El compuesto o DMSO se agregó a las células, y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. El substrato NanoBRET™ Nano-Glo® se agregó a las células y las células se sacudieron durante 30 seg. Las emisiones del donante (460 nm) y del aceptor (618) se midieron en un lector multimodo Synergy Neo2 (BioTek, Winooski, VT) dentro de los 10 minutos posteriores a la adición del substrato. Los datos se reportan como relación de BRET (Aceptor/Donante).

El compuesto 2 inhibió de manera inesperada la estimulación de la formación de oligómeros PERK, con una CE₅₀ de 1.6 nM. En la figura 1 se muestra una gráfica de los oligómeros PERK de estimulación inducidos por el Compuesto 2. 2.

EJEMPLO 37

Estimulación de las proteínas de la trayectoria de señalización UPR/ISR del mieloma múltiple ATF4 y CHOP

Las células de mieloma múltiple H929 (catálogo #CRL-9068) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA), se hicieron crecer en RPMI 1640 suplementado con 20 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 % de penicilina/estreptomicina/L-glutamina y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad y mantenido a 1-2 millones de células por mL. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a 4 millones de células por pozo en 2 mL de medio de crecimiento completo y se trataron con una dilución en serie de compuestos de prueba durante 4 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS suplementado con inhibidor de proteasa Halt 1X, inhibidor de fosfatasa Halt 1X, cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa Sigma 1X y EDTA 1X y luego se lisaron con reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER suplementado con 3X de la mezcla del inhibidor como se describió arriba. Los lisados celulares se sonicaron con

sonicador en baño de agua (Qsonica, Newtown, CT) y los sobrenadantes se hirvieron con regulador de pH de SDS y agente de reducción. Western blot se realizó para cuantificar ATF4, CHOP y beta-Actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE).

- 5 El compuesto 2 exhibió inesperadamente la estimulación de la actividad de UPR/ISR en células de mieloma múltiple H929. Una figura de las proteínas de señalización corriente abajo de PERK de estimulación ATF4 y CHOP (Actina como control de carga) se muestra en la figura 3. ATF4 se estimula a través de una escala de concentración de 4.5 nM a 123 nM. CHOP se estimula a través de una escala de concentración de 4.5 nM a 41 nM.

10

EJEMPLO 38

Estimulación de genes objetivo UPR/ISR de mieloma múltiple mediante RT-PCR cuantitativa

- 15 Células de mieloma múltiple H929 (catálogo #CRL-9068) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en un medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero de bovino fetal inactivado con calor (catálogo #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% de Penicilina / Estreptomina / L-Glutamina (catálogo #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol (catálogo #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar una confluencia del 70-95 %, momento en el que se subcultivaron o recolectaron para su uso en ensayos. Las células se sembraron en una placa de cultivo de 6 pozos a 3.0x10⁶ células por pozo en 2 mL de medio de crecimiento completo y se incubaron con las concentraciones indicadas del Compuesto 2 a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de
- 20 humedad durante 4 h. Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS (Sigma) y el ARN se extrajo con los kits RNeasy® Plus (Qiagen, Germantown, MD). El ADNc se sintetizó con el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosciences, Beverly Hills, CA) y la PCR cuantitativa se realizó en un QuantStudio 3 (Applied Biosciences) con los ensayos TaqMan (Cuadro 1, Thermo) y TaqMan Fast Advanced Master Mix (Termo) de acuerdo con las especificaciones del
- 25 fabricante.
- 30

Cuadro: Sondas TaqMan	
Gen de interés	ID del ensayo
ATF4	Hs00909569_g1
DDIT3 (CHOP)	Hs00358796_g1
GPT2	Hs00370287_m1
GUSB (Control endógeno)	Hs00939627_m1
PPP1R15A (GADD34)	Hs00169585_m1
VEGFA	Hs00900055_m1

El Compuesto 2 indujo de manera inesperada la expresión de los genes objetivo UPR/ISR en células de mieloma múltiple H929. Los datos reportados como cambio múltiplo sobre la muestra tratada con control de vehículo (DMSO). La figura 4 es una representación gráfica que demuestra la estimulación de los genes objetivo de ATF4 en respuesta a concentraciones crecientes del Compuesto 2 (barras negras de DMSO, barras color gris oscuro de 1.5 nM, barras cuadriculadas de 14 nM, barras rayadas de 41 nM, barras color gris claro de 123 nM y barras punteadas de 370 nM). La activación transcripcional de los genes objetivo ATF4 ocurrió en forma de campana. La estimulación máxima para ATF4 en puntos de tiempo de 4 h fue ~3 veces; la estimulación máxima para CHOP a las 4 h fue de ~10 veces; la estimulación máxima para GADD34 a las 4 h fue ~3 veces; la estimulación máxima para GPT2 a las 4 h fue ~3 veces; la estimulación máxima para VEGFA a las 4 h fue ~2 veces. La estimulación de los genes objetivo ATF 4 se produjo en forma de campana en la que se encontró que los niveles alcanzaban su punto máximo en concentraciones que oscilaban entre 14 y 123 nM, la escala de concentración en el que el Compuesto 2 ocupaba el 50 % o menos de las moléculas de PERK, seguido de una fase inhibidora en la que se revertía la expresión a niveles basales en concentraciones superiores o equivalentes a 370 nM del Compuesto 2.

EJEMPLO 39

Estimulación de la trayectoria de señalización de la apoptosis del mieloma múltiple

20

Las células de mieloma múltiple H929 (catálogo #CRL-9068) se obtuvieron del American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA), se hicieron crecer en RPMI 1640 suplementado con 20 % de suero bovino fetal inactivado por calor (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 % de penicilina/estreptomicina/L-glutamina y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad y mantenido a 1-2 millones de células por mL. Las células se sembraron en placas de 6 pozos a 4 millones de células por pozo en 2 mL de medio de crecimiento completo y se trataron con una dilución en serie de compuestos de prueba durante 24 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Al final de la incubación, las células se lavaron con PBS suplementado con inhibidor de proteasa Halt 1X, inhibidor de fosfatasa Halt 1X, cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa Sigma 1X y EDTA 1X y luego se lisaron con reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER suplementado con 3X de la mezcla del inhibidor como se describió arriba. Los lisados celulares se sonicaron con sonicador en baño de agua (Qsonica, Newtown, CT) y los sobrenadantes se hirvieron con regulador de pH de SDS y agente de reducción. El Western blot se realizó para cuantificar la caspasa 3 escindida, la caspasa 7 escindida, la PARP y la beta-actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR,

35

Lincoln, NE).

El Compuesto 2 indujo de manera inesperada la expresión de las proteínas proapoptóticas en células de mieloma múltiple H929. El tratamiento de las células con el Compuesto 2 dio como resultado un incremento en los niveles de PARP escindida, Caspasa-7 escindida y Caspasa-3 escindida. La estimulación de estas lecturas apoptóticas ocurrieron en forma de campana y alcanzaron su punto máximo en escalas de concentración de 4.5 nM a 41 nM.

EJEMPLO 40

Inhibición de la proliferación de células de mieloma múltiple y linfoma de células B

10

Las células H929, RPMI8226, GA-10 y DoHH-2 (catálogo #CRL-9068) se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATTC, Manassas, VA). Las células H929 se mantuvieron en un medio RPMI-1640 suplementado con 20% de suero de bovino fetal inactivado con calor (catálogo #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% de Penicilina / Estreptomina / L-Glutamina (catálogo #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), y 0.05 mM de 2-mercaptoetanol (catálogo #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). RPMI8226, GA-10, DoHH-2 se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero de bovino fetal inactivado por calor (catálogo #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y 1% de Penicilina/Estreptomina/L-Glutamina (catálogo #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). Todas las células se hicieron crecer a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las células se expandieron hasta alcanzar un millón quinientas mil células por mL momento en el que se subcultivan o recolectan para su uso en ensayos.

Para el ensayo de proliferación celular, el número apropiado de células (Cuarenta mil células para H929. Veinte mil células para RPMI8226 y GA-10. Ocho mil células para DoHH-2) se sembraron por pozo en 200 µL en un medio respectivo se dispensaron en una placa de fondo transparente negra de 96 pozos. Se agregó una dilución en serie del compuesto de prueba por triplicado y las placas se incubaron durante 72 o 120 h a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. Se utilizaron varios agentes estándar de atención para los estudios de combinación (Lenalidomida (catálogo #S1029, Selleckchem, Houston, TX), Bortezomib (catálogo #S1013, Selleckchem, Houston, TX), Dexametasona (catálogo #S1322, Selleckchem, Houston, TX), Ibrutinib (Pharmacyclics, Sunnyvale, CA)). Al final de la incubación para H929, RPMI8226 and GA-10, 40 µL de una solución 440 mM de resazurina (Sigma, St. Louis, MO) en PBS se agregó a cada pozo de la placa y las placas se incubaron durante 7 h adicionales a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad. Las placas se leyeron en un lector Synergy2 o lector equivalente (Biotek, Winooski VT) utilizando una excitación de 540 nm y una emisión de 600 nm. Al final de la incubación de DoHH-2, la disponibilidad celular de

35

determinó utilizando el ensayo CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI). La luminiscencia se midió con lector EnVision MultiLabel (PerkinElmer, Waltham, MA). Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI_{50} .

El Compuesto 2, en combinación con agentes estándar de atención (SOC) que tratan el mieloma múltiple o los linfomas de células B, muestra aditividad o sinergia para la inhibición de la proliferación celular. Las gráficas representativas se muestran en las figuras 6A, 6B, 6C, y 6D. La figura 6A representa un experimento de proliferación celular de células de mieloma múltiple RPMI8226 tratadas con el título del Compuesto 2 con (diamante color gris) o sin (círculos negros) 333 nM de dexametasona durante 96 h. El tratamiento de combinación dio como resultado la inhibición de la proliferación celular con una CI_{50} de 7 nM. La figura 6B representa un experimento de proliferación celular de las células de mieloma múltiple H929 tratadas con el título del Compuesto 2 con (cuadrados color gris) o sin (círculos negros) 3 nM de bortezomib durante 96 h. El tratamiento de combinación dio como resultado la inhibición de la proliferación celular con una CI_{50} de 6 nM. La figura 6C representa un experimento de proliferación celular de células de linfoma de Burkitt GA-10 tratadas con el título del Compuesto 2 con (triángulo color gris) o sin (círculos negros) 50 nM de dexametasona durante 96 h. El tratamiento de combinación dio como resultado la inhibición de la proliferación celular con una CI_{50} de 4 nM. La figura 6D representa un experimento de proliferación celular de las células de linfoma folicular tratadas con el título del Compuesto 2 con (estrellas color gris) o sin (círculos negros) 41 nM de ibrutinib durante 96 h. El tratamiento de combinación dio como resultado la inhibición de la proliferación celular con una CI_{50} de 4 nM.

EJEMPLO 41

Modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) de xenoinjerto CCRF-CEM

El modelo de xenoinjerto CCRF-CEM se realizó de conformidad con todas las leyes, reglamentos y pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Labcorp (Ann Arbor, MI), una instalación acreditada por AAALAC. El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. Todos los ratones fueron observados para signos clínicos por lo menos una vez al día. Envigo C.B-17 SCID hembras (6-7 semanas de edad) se inocularon de manera subcutánea justo por debajo la axila superior derecha con diez millones de células en solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, utilizando una aguja y una jeringa de calibre 27. Cuando las cargas tumorales alcanzaron 200 mm³ en promedio el día 22, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de manera que la carga tumoral media para todos los grupos estuviera dentro del 10 % de la carga tumoral media general para la población de estudio. Los grupos fueron tratados los días 23-24 de la siguiente manera: el día 23 control de

vehículo (dosificado por vía oral e IP para imitar grupos de combinación) (n=9); ASNasa (Abcam, Cambridge, Reino Unido) dosificado IP en 1000 U/kg/día (n=9). El día 24, control del vehículo (dosificado por vía oral e IP para imitar los grupos de combinación) (n=9); Compuesto 2 dosificado por vía oral a 50 mg/kg/día del Compuesto 2 (n=9) y ASNasa (Abcam, Cambridge, Reino Unido) dosificado IP a 1000 U/kg/día (n=9) 2 h antes de la recolección de la muestra; Compuesto 2 dosificado por vía oral a 25 mg/kg/día del Compuesto 2 (n=9) y ASNasa (Abcam, Cambridge, Reino Unido) dosificado IP a 1000 U/kg/día (n=9) 2 h antes de la recolección de la muestra a las 2, 6 y 10 h después de la dosis del Compuesto 2. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de K2EDTA y se procesaron en plasma, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y luego se almacenaron a -80 °C. Las muestras de plasma se sometieron a análisis farmacocinético utilizando cromatografía líquida acoplada con análisis de espectrometría de masas en tándem (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se recolectaron tumores y tejidos pancreáticos y se pulverizaron sobre nitrógeno líquido en bolsas covaris y se almacenaron a -80°C. Para procesamiento de muestra de tejido aproximadamente 30 mg de tumor o tejido pancreático se lisaron en regulador de pH de lisis mPER (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con inhibidor de proteasa Halt 3X, inhibidor de fosfatasa Halt 3X, cóctel inhibidor de fosfatasa Sigma 3X 2 y EDTA 3X en hielo luego se homogeneizaron usando Bead Ruptor 96 (Omni, Kennesaw, GA). Las muestras entonces se sometieron a centrifugado a 21,000 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, los lisados aclarados se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo cónico enfriadas con hielo, se sellaron y luego se almacenaron a -80 °C. Al día siguiente, las muestras se descongelaron en hielo y luego se centrifugaron a 3739 g durante 10 min a 4 °C. A continuación, los lisados aclarados se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo redondo enfriadas con hielo. Las concentraciones de las proteínas se determinaron utilizando un kit de ensayo de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los lisados se normalizaron a 10 µg/µL antes de hervir en un regulador de pH de muestra 4X SDS y agente de reducción. Las muestras se resolvieron utilizando SDS-PAGE luego se analizaron utilizando Western blot para cuantificar fosfo-GCN2 (Thr899) (Abcam, Cambridge, UK), GCN2, ATF4 y beta-Actina totales (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE). Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular el % de inhibición.

El Compuesto 2, en combinación con ASNasa, inhibe los niveles de ATF4 mediados por GCN2 en un moldeo de xenoinjerto de leucemia CCRF-CEM. Como se muestra en la figura 7, el Compuesto 2 inhibió los niveles de ATF4 por 87 al 91% en comparación con el control de vehículo cuando se dosifica a 50 mg/kg oralmente, e inhibió los niveles de ATF4 por 57% a 93% en comparación con el control del vehículo cuando se dosifica a 25 mg/kg oralmente. Los niveles en plasma correspondientes del Compuesto 2 se determinaron en los puntos en el tiempo PD de 2, 6, y

10 horas después de la dosificación.

EJEMPLO 42

Modelo de eficacia del xenoinjerto MV-4-11

5

El modelo de xenoinjerto MV-4-11 se realizó de conformidad con todas las leyes, reglamentos y pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Biosciences (Taicang, China), una instalación acreditada por AAALAC. El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. Todos los ratones fueron observados para signos clínicos por lo menos una vez al día. NOD/SCID hembra (6-9 semanas de edad; Vital River Laboratories Research Models and Services (Beijing, China)) se inocularon por vía subcutánea en la región del flanco anterior derecho con cinco millones de células en solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco: Matrigel (1:1), utilizando una aguja y una jeringa de calibre 27. Cuando las cargas tumorales alcanzaron 150 mm³ en promedio el día 7, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de manera que la carga tumoral media para todos los grupos estuviera dentro del 10 % de la carga tumoral media general para la población de estudio. Los grupos fueron tratados los días 7-21 de la siguiente manera: control del vehículo (dosificados por vía oral e IP para imitar grupos de combinación) (n=10); Compuesto 2 dosificado por vía oral a 50 mg/kg/día del Compuesto 2 (n=10); Leunasa (Kyowa Kirin, Japón) dosificada IP a 1000 U/kg/día (n=10); Leunasa (Kyowa Kirin, Japón) dosificada IP a 1000 U/kg/día (n=10) y el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 50 mg/kg/día del Compuesto (n=10). El volumen del tumor y el peso del cuerpo se midieron tres veces por semana. La carga tumoral (mg) se estimó a partir de mediciones de calibre por medio de la fórmula: Carga tumoral (mg=mm³) = (longitud x ancho²)/2.

El compuesto 2, en combinación con ASNasa, inhibe el crecimiento tumoral MV-4-11 cuando se dosifica por vía oral. Como se muestra en la figura 8, no se observó un efecto importante en el crecimiento tumoral después de 14 días de dosificación con 50 mg/kg/día del Compuesto 2 como agente único. A 50 mg/kg/día del Compuesto 2 combinado con Leunasa, la inhibición media del crecimiento tumoral fue 54% después de 14 días de dosificación.

30

EJEMPLO 43

Ensayo de activación de GCN2 recombinante

GCN2(EIF2AK4) recombinante (Carna Biosciences, Japón) fue desfosforilado al incubarlo con 16,000 unidades de lambda fosfatasa (New England Biolabs, Ipswich, MA) durante 3 h a 30 °C en regulador de pH de reacción de fosfatasa 1X. Para medir la modulación de GCN2 mediada

35

por el Compuesto 2, GCN2 desfosforilado 12.5 nM diluido en regulador de pH de quinasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) se incubó con el título del Compuesto 2 durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregó el sustrato 130 nM (GFP-eIF2a) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y 0.05 mM de ATP a la mezcla y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente.

5 La reacción se detuvo por la adición de 10 mM de EDTA y el sustrato de eIF2a fosforilado se detectó utilizando anticuerpo LanthaScreen Tb-anti-peIF2a (pSer52) 2 nM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) luego se incubó en la oscuridad. Después de incubación durante 60 min a temperatura ambiente, TR-FRET se monitoreó utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm y longitudes de onda de emisión de 490 nm y 520 nm.

10 En la figura 9A, a concentraciones que oscilan de 0.05-3 nM el Compuesto 2 activó inesperadamente la enzima GCN2 hasta el 250 % del control. A concentraciones por arriba de 10 nM, el Compuesto 2 inhibió la actividad de la enzima GCN2 recombinante *in vitro*.

EJEMPLO 44

Ensayo de activación de PERK recombinante

Para medir la modulación de PERK mediada por el Compuesto 2, la enzima de PERK 200 nM (Enzo, Farmingdale, NY) se incubó con el título del Compuesto 2 durante 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se agregó el sustrato 200 nM (GFP-eIF2a) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y 1 mM de ATP a la mezcla y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por la adición de 10 mM de EDTA y el sustrato de eIF2a fosforilado se detectó utilizando anticuerpo LanthaScreen Tb-anti-peIF2a (pSer52) 2 nM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) luego se incubó en la oscuridad. Después de incubación durante 60 min a temperatura ambiente, TR-FRET se monitoreó utilizando una longitud de onda de excitación de 340 nm y longitudes de onda de emisión de 490 nm y 520 nm.

En la figura 9B, a concentraciones que oscilan de 0.05-6 nM el Compuesto 2 activó inesperadamente la enzima PERK hasta el 250 % del control. A concentraciones por arriba de 3 μ M, el Compuesto 2 inhibió la actividad de la enzima PERK recombinante *in vitro*.

EJEMPLO 45

Ensayo de Western Blot de esferoides

Las líneas celulares NSCLC H358 (catálogo # CRL-5807) y H2030 (catálogo # CRL-5914), y línea celular de fibrosarcoma HT-1080 (catálogo # CRL-5807) se obtuvieron de American Type Culture Collect (ATTC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en medio RPMI-1640

suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad y se mantuvo a 50-80% de confluencia hasta su uso. Las células se colocaron en placas de 500,000 células/pozo en placas Elplasia de 24 pozos (Corning, Glendale, AZ) con medio de crecimiento completo a 1 mL/pozo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad para formar esferoides. Al siguiente día, las diluciones en serie de los compuestos de prueba se prepararon en medio de cultivo completo y se extrajeron 500 µL del medio existente de cada pozo y se reemplazaron con medio fresco que contenía títulos compuestos. Los esferoides entonces luego se incubaron con los compuestos de prueba durante 4 horas o 24 horas bajo las mismas condiciones. Al final de la incubación, los esferoides se lavaron con PBS suplementado con inhibidor de proteasa Halt 1X, inhibidor de fosfatasa Halt 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA), cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa Sigma 1X (Sigma, St. Louis, MO) y EDTA 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA) y luego se lisaron con reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 3X de la mezcla del inhibidor como se describió arriba. Los lisados celulares se sonicaron con sonicador en baño de agua (Qsonica, Newtown, CT) y los sobrenadantes se hirvieron con regulador de pH de SDS y agente de reducción. Se realizaron Western blots para cuantificar fosfo-GCN2 (R&D Systems, Minneapolis, MN), ATF4, CHOP, PARP escindida, Caspasa 3 y 7 escindida y beta-actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE).

En las figuras 10A, 10B, y 10C, el Compuesto 2 exhibió inesperadamente la estimulación de ISR y las trayectorias de apoptosis en cánceres de tumores sólidos (la figura 10A, H2030; la figura 10B, H358; la figura 10C, HT-1080). Se muestra una imagen de Western blot de la fosforilación de GCN2 regulada al alza (pGCN2) y la proteína de señalización ATF4 corriente abajo y los marcadores de la trayectoria pro-apoptosis (PARP 1 escindida, Caspasa escindida 3/7) (actina como control de carga) se muestra en las figuras 10A, 10B, y 10C. Los niveles de pGCN2 fueron regulados al alza en las líneas celulares H2030 y H358, y ATF4, c-PARP y c-Caspasa7 se regularon al alza a través de una escala de concentración de 4.6 nM y hasta 300 nM. La cuantificación del Western blot de la señal ATF4 se representa en el formato de la gráfica de barras. El Compuesto 2 reguló al alza ATF4 hasta 20 veces en los esferoides H2030, 12 veces en los esferoides H358 y 15 veces en los esferoides HT-1080.

EJEMPLO 46

Ensayo de proliferación de esferoides

Líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) H358

(catálogo # CRL-5807) y H2030 (catálogo # CRL-5914), y línea de fibrosarcoma HT-1080 (catálogo # CRL-5807) se obtuvieron de American Type Culture Collect (ATTC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad y se mantuvo a 50-80% de confluencia hasta su uso. 500-1000 células se colocaron en placas de fijación ultra-baja de 96 pozos (Corning, Glendale, AZ) con medio de crecimiento completo a 80 µL/pozo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad para formar esferoides. Al siguiente día, las diluciones en serie de los compuestos de prueba se prepararon en medio de cultivo completo y se agregaron 20 µL/pozo de medios que contenían títulos compuestos a esferoides por triplicado. Los esferoides entonces luego se incubaron con los compuestos de prueba durante 5 días bajo las mismas condiciones. Al final de la incubación, los esferoides se lisaron con 100 µL/pozo de Ensayo de viabilidad 3D CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) y la luminiscencia se detectó utilizando un lector Synergy2 o equivalente (Biotek, Winooski, VT). Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular los valores de CI₅₀.

En las figuras 11A, 11B, y 11C, el Compuesto 2 indujo una regresión celular del 50 % en los esferoides de tumor sólido H2030 como un solo agente (figura 11A). El Compuesto 2 inhibió la proliferación celular de esferoides de tumores sólidos H358 (CI₅₀ 10nM, figura 11B) y HT-1080 (CI₅₀ 12 nM, figura 11C) como un solo agente.

En las figuras 12A, 12B, y 12C, el Compuesto 2, en combinación con agentes estándar de atención (SOC) exhibió aditividad o sinergia para la inhibición de crecimiento de esferoides. Las gráficas representativas se muestran en las figuras 12A, 12B, y 12C. La figura 12A representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H2030 tratados con el título del Compuesto 2 en combinación con sotorasib 3.3 nM (diamantes) o sin sotorasib (círculos) durante 96 h. La figura 12B representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H358 tratados con el título del Compuesto 2 en combinación con sotorasib 3.3 nM (diamantes) o sin sotorasib (círculos) durante 96 h. La figura 12C representa un experimento de proliferación celular de esferoides de NSCLC H2030 con el título del Compuesto 2 en combinación con 3.7 nM de trametinib (triángulos) o sin trametinib (círculos) durante 96 h. En los tres experimentos, el tratamiento combinado dio como resultado una mayor regresión de esferoides en comparación con cualquiera de los agentes individuales.

EJEMPLO 47**Ensayo de silenciamiento génico (knockdown) de ARNhc HT-1080**

La línea celular de fibrosarcoma HT-1080 (catálogo # CRL-5807) se obtuvo de American Type Culture Collect (ATTC, Manassas, VA). Las células se hicieron crecer en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor y 1% de Penicilina/Estreptomicina/L-Glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad y se mantuvo a 50-80% de confluencia hasta su uso. Las construcciones que expresan ARNhc dirigidas a PERK, GCN2 o control codificado se obtuvieron de MISSION (Sigma, St. Louis, MO) y los lentivirus que contenían cada construcción se produjeron internamente. Las células se colocaron en placas en 400,000 células/pozo en placas de cultivo de tejido de 6 pozos (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) con medio de crecimiento completo y se incubaron durante la noche a 37 °C, 5% de CO₂, y 95% de humedad para unir. Al siguiente día, los medios existentes se retiraron de cada pozo y se repusieron con 1 mL/pozo de medio fresco que contiene 5 µg/mL de polibreno (VectorBuilder, Chicago, IL). Las células fueron transducidas con 200 µL/pozo de lentivirus correspondiente durante 24 horas antes de procesarse para western blot y ensayos de proliferación celular.

En la figura 13A el GCN2 total se silenció génicamente en un 57 % mediante el uso de ARNhc dirigidos en la línea celular HT-1080. PERK se silenció génicamente en un 65% utilizando ARNhc objetivo en la línea celular HT-1080. La regulación al alza mediada por el Compuesto 2 de los marcadores ISR (ATF4, pEIF2α y CHOP) se reguló a la baja tras el silenciamiento génico de GCN2 o PERK. La figura 13B representa la cuantificación del Western blot de la señal ATF4. La regulación al alza mediada por el Compuesto 2 de ATF4 se redujo en un 75% tras el silenciamiento génico de GCN2. La regulación al alza mediada por el Compuesto de ATF4 se redujo en un 50% tras el silenciamiento génico de PERK. En la figura 13C, la inhibición del crecimiento de esferoides mediada por el Compuesto 2 se atenuó tras el silenciamiento génico de GCN2 pero no de PERK en esta línea de células de tumor sólido.

EJEMPLO 48**Modelo farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) de xenoinjerto de fibrosarcoma HT-1080**

El modelo de xenoinjerto HT-1080 se realizó de conformidad con todas las leyes, reglamentos y pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Labcorp (Ann Arbor, MI), una instalación acreditada por AAALAC. El

alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. Todos los ratones fueron observados para signos clínicos por lo menos una vez al día. Ratones desnudos hembra (6-7 semanas de edad) se inocularon de manera subcutánea justo por debajo la axila superior derecha con dos millones de células en solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, utilizando una aguja y una jeringa de calibre 27. Cuando las cargas tumorales alcanzaron 150 mm³ en promedio el día 6, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de manera que la carga tumoral media para todos los grupos estuviera dentro del 10 % de la carga tumoral media general para la población de estudio. Los grupos fueron tratados los días 6-11 de la siguiente manera: control del vehículo (dosificado por vía oral) (n=9); El Compuesto 2 dosificado por vía oral a 10 mg/kg de BID (n=9); el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 5 mg/kg de BID; el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 1 mg/kg de BID (n=9) antes de la recolección de la muestra a las 2, 6 y 10 h después de la dosis el día 11. Las muestras de sangre se recolectaron en tubos de K2EDTA y se procesaron en plasma, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y luego se almacenaron a -80 °C. Las muestras de plasma se sometieron a análisis farmacocinético utilizando cromatografía líquida acoplada con análisis de espectrometría de masas en tándem (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Se recolectaron tumores y se pulverizaron sobre nitrógeno líquido en bolsas covaris y se almacenaron a -80°C. Para procesamiento de muestra de tejido aproximadamente 30 mg de tejido de tumor se lisaron en regulador de pH de lisis MPER (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) suplementado con inhibidor de proteasa Halt 3X, inhibidor de fosfatasa Halt 3X, cóctel inhibidor de fosfatasa Sigma 3X 2 y EDTA 3X en hielo luego se homogeneizaron usando Bead Ruptor 96 (Omni, Kennesaw, GA). Las muestras entonces se sometieron a centrifugado a 21,000g durante 10 min a 4 °C. A continuación, los lisados aclarados se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo cónico enfriadas con hielo, se sellaron y luego se almacenaron a - 80 °C. Al día siguiente, las muestras se descongelaron en hielo y luego se centrifugaron a 3739g durante 10 min a 4 °C. A continuación, los lisados aclarados se transfirieron a placas de 96 pozos de fondo redondo enfriadas con hielo. Las concentraciones de las proteínas se determinaron utilizando un kit de ensayo de proteína BCA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los lisados se normalizaron a 10 µg/µL antes de hervir en un regulador de pH de muestra 4X SDS y agente de reducción. Las muestras se resolvieron utilizando SDS-PAGE luego se analizaron utilizando Western blot para cuantificar ATF4 y beta-Actina (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Las membranas se formaron en imágenes con el sistema de imágenes LI-COR Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE). Los datos se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (GraphPad, San Diego, CA) para calcular el % de inhibición.

En las figuras 14 y 14B, el compuesto 2 reguló al alza los niveles de ATF4 en un modelo de xenoinjerto PK/PD de fibrosarcoma HT-1080. Como se muestra en la figura 14A, el Compuesto 2 reguló al alza los niveles de ATF4 4.5 veces en comparación con el control de vehículo

cuando se dosificó a 10 mg/kg de BID por vía oral, reguló al alza los niveles de ATF4 3.5 veces en comparación con el control de vehículo cuando se dosificó a 5 mg/kg de BID por vía oral, y reguló al alza los niveles de ATF4 3 veces en comparación con el control de vehículo cuando se dosificó a 1 mg/kg de BID por vía oral. Los niveles en plasma correspondientes del Compuesto 2 se determinaron en los puntos en el tiempo PD de 2, 6, y 10 horas después de la dosificación (la figura 14B).

EJEMPLO 49

Modelo de eficacia del xenoinjerto LoVo

10

El modelo de xenoinjerto LoVo se realizó de conformidad con todas las leyes, reglamentos y pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Biosciences (Ann Arbor, MI), una instalación acreditada por AAALAC. El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. Todos los ratones fueron observados para signos clínicos por lo menos una vez al día. Ratones desnudos Balb/c hembra (5-9 semanas de edad) se inocularon de manera subcutánea justo por debajo la axila superior derecha con diez millones de células en solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, utilizando una aguja y una jeringa de calibre 27. Cuando las cargas tumorales alcanzaron 100 mm³ en promedio el día 6, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de manera que la carga tumoral media para todos los grupos estuviera dentro del 10 % de la carga tumoral media general para la población de estudio. Los grupos fueron tratados los días 6-27 de la siguiente manera: control del vehículo (dosificado por vía oral) (n=9); el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 5 mg/kg de BID (n=9); el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 1 mg/kg de BID. El volumen del tumor y los pesos del cuerpo se midieron tres veces por semana. La carga tumoral (mg) se estimó a partir de mediciones de calibre por medio de la fórmula: Carga tumoral (mg=mm³) = (longitud x ancho²)/2.

25

EJEMPLO 50

Modelo de eficacia del xenoinjerto HT-1080

30

El modelo de xenoinjerto HT-1080 se realizó de conformidad con todas las leyes, reglamentos y pautas de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y con la aprobación del Comité de Cuidado y Uso de Animales de Labcorp (Ann Arbor, MI), una instalación acreditada por AAALAC. El alimento y el agua se proporcionaron ad libitum. Todos los ratones fueron observados para signos clínicos por lo menos una vez al día. Ratones desnudos hembra (6-7 semanas de edad) se inocularon de manera subcutánea justo por debajo la axila superior derecha con dos millones de

35

células en solución salina regulada en su pH con fosfato de Dulbecco, utilizando una aguja y una jeringa de calibre 27. Cuando las cargas tumorales alcanzaron 100 mm³ en promedio el día 6, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de manera que la carga tumoral media para todos los grupos estuviera dentro del 10 % de la carga tumoral media general para la población de estudio. Los grupos fueron tratados los días 6-14 de la siguiente manera: control del vehículo (dosificado por vía oral) (n=9); el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 10 mg/kg de BID (n=9); el Compuesto 2 dosificado por vía oral a 5 mg/kg de BID. El volumen del tumor y el peso del cuerpo se midieron tres veces por semana. La carga tumoral (mg) se estimó a partir de mediciones de calibre por medio de la fórmula: Carga tumoral (mg=mm³) = (longitud x ancho²)/2.

Como se muestra en la figura 15A, el Compuesto 2 inhibió el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto colorrectal LoVo. La inhibición media del crecimiento tumoral fue del 69% después de 22 días de dosificación del Compuesto 2 a 5 mg/kg de BID. La figura 15B, el Compuesto 2 inhibió el crecimiento tumoral del modelo de xenoinjerto de fibrosarcoma HT-1080. La inhibición media del crecimiento tumoral fue del 50% después de 14 días de dosificación del Compuesto 2 a 10 mg/kg de BID.

Equivalentes

Aunque se han descrito modalidades específicas, la especificación anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de las modalidades se harán evidentes para aquellos expertos en la técnica tras la revisión de esta especificación. El alcance completo de lo que se describe debe ser determinado por referencia a las reivindicaciones, junto con su alcance completo de los equivalentes, y a la especificación, junto con tales variaciones.

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc. usados en la especificación y reivindicaciones serán entendidos como siendo modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se buscan obtener.