

INHIBIDORES DE MOLÉCULA PEQUEÑA DE PROTEÍNAS KRAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Provisionales de los EE.UU. N.º 63/591.871, presentada el 20 de octubre de 2023, 63/638.789, presentada el 25 de abril de 2024, y 63/680.205, presentada el 7 de agosto de 2024, cuyas divulgaciones se han incorporado por referencia en su totalidad al presente documento.

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente divulgación se refiere a inhibidores de molécula pequeña de KRAS que inhiben, por ejemplo, el mutante G12C, el mutante G12D, el mutante G12V, el mutante G13D y el tipo silvestre (TS) de la proteína del sarcoma de rata de Kirsten (KRAS) y se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), así como a métodos de uso de un compuesto de este tipo para el tratamiento de enfermedades, incluyendo cánceres.

ANTECEDENTES

[0003] RAS, que es una proteína de unión a GTP monomérica pequeña que tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa, actúa como un interruptor de encendido/apagado molecular. RAS puede unirse a GTP mediante la unión a proteínas de un factor de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF) (por ejemplo, SOS1), que fuerza la liberación de un nucleótido unido y libera GDP. Cuando RAS se une a GTP, se activa (se enciende) y recluta y activa las proteínas necesarias para la propagación de las señales de otros receptores, tales como c-Raf y PI 3-cinasa. RAS también posee actividad enzimática con la que escinde el fosfato terminal del nucleótido de GTP y convierte el nucleótido en GDP. La tasa de conversión por lo general es lenta, pero puede acelerarse drásticamente mediante una proteína de la clase de proteínas activadoras de GTPasa (GAP), tal como RasGAP. Cuando el GTP se convierte en GDP, RAS está desactivada (apagada).

[0004] Los miembros habitualmente conocidos de la subfamilia RAS incluyen HRAS, KRAS y NRAS. De éstas, se observan mutaciones de KRAS en muchos tumores malignos: en el 86 % de los adenocarcinomas ductales pancreáticos (ACDP), en el 41 % de los cánceres colorrectales (CCR) y en el 32 % del adenocarcinoma de pulmón (ACP; un subtipo de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM)). Las mutaciones con frecuencia se producen en el resto glicina en la posición 12 de KRAS ("G12"); la mutación en G12 domina el 91 %

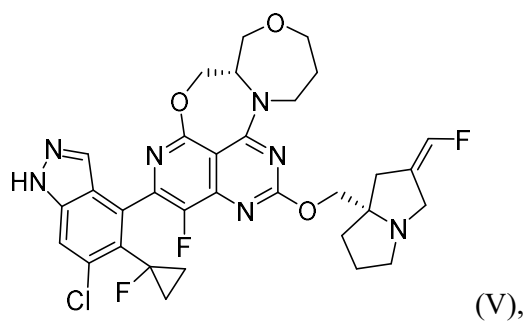
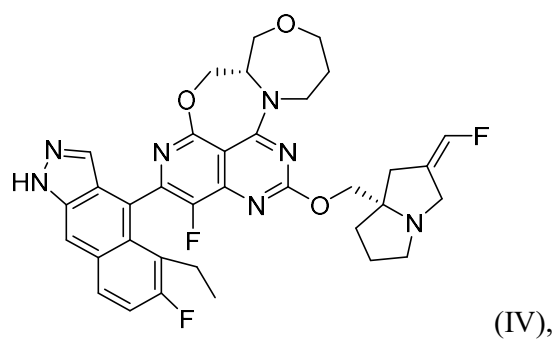
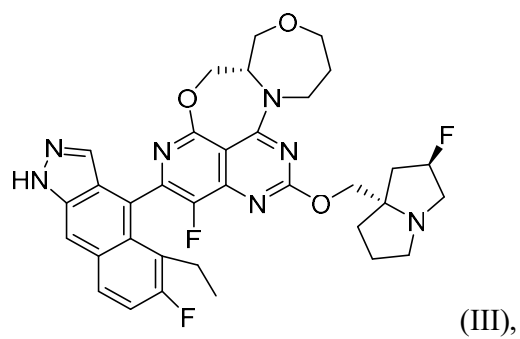
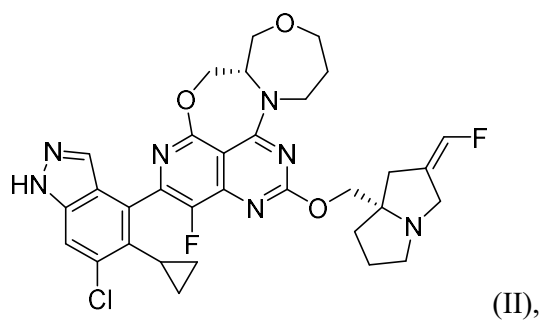
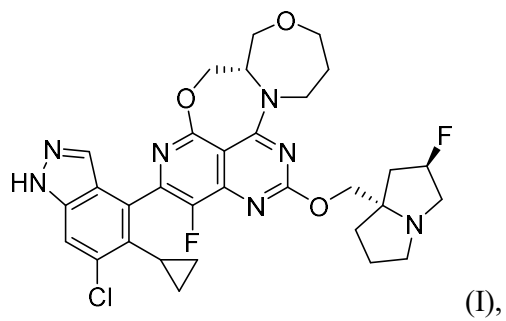
(ACDP), el 68 % (CCR) y el 85 % (ACP) del total de mutaciones de KRAS, respectivamente. Las distribuciones de sustituciones de aminoácidos en G12 varían entre cada tipo de tejido. La mutación más frecuente en el ACP es la mutación en cisteína ("G12C") (46 %), mientras que la mutación predominante en ACDP (45 %) y CCR (45 %) es la mutación en el ácido aspártico ("G12D"). La mutación en G12 en valina ("G12V") se observa en una porción significativa de las mutaciones G12 en todos los ACDP (35 %), CCR (30 %) y ACP (23 %). (*Nature Reviews Drug Discovery*, 19, 533-552, 2020).

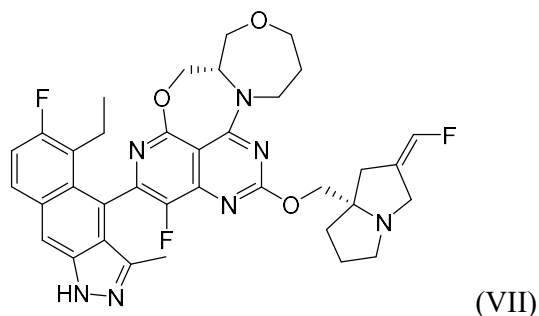
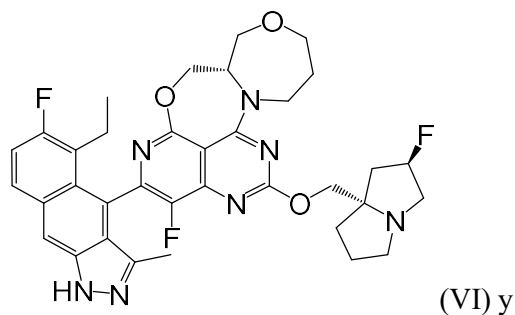
[0005] Se están realizando esfuerzos intensos para desarrollar inhibidores de KRAS-G12C. Se han publicado varios inhibidores covalentes que se centran en el resto cisteína, y algunos de ellos se han sometido a estudios clínicos, tales como AMG510 (NCT03600883), MRTX849 (NCT03785249) y JNJ-74699157 (NCT04006301). Sin embargo, la mutación de KRAS-G12C sólo representa una fracción de todas las mutaciones de KRAS y se encuentra principalmente en ACP. Para inhibir eficazmente las otras proteínas mutadas de KRAS que se producen habitualmente, tales como KRAS-G12D y KRAS-G12V, se necesitan diferentes enfoques ya que estos mutantes carecen de cisteínas reactivas en el sitio activo (*Nature Reviews Drug Discovery*, 19, 533-552, 2020).

[0006] Los estudios también han indicado que en determinados cánceres también pueden ocurrir la amplificación génica y la expresión elevada de KRAS TS en ausencia de mutaciones codificantes. Estas amplificaciones se observaron con mayor frecuencia en adenocarcinomas de esófago, gástricos y de ovario (*Nature Medicine*, 24, 968-977, 2018). Por lo tanto, la inhibición eficaz de KRAS TS podría proporcionar un beneficio terapéutico a los pacientes que padecen dichos cánceres.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

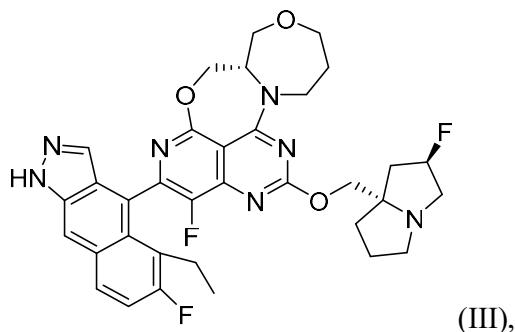
[0007] La presente divulgación proporciona inhibidores de molécula pequeña que modulan proteínas KRAS mutantes y TS y pueden ser compuestos farmacéuticamente activos valiosos para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, los compuestos divulgados inhiben selectivamente las proteínas KRAS-G12C, KRAS-G12D y/o KRAS-G12V. Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII):

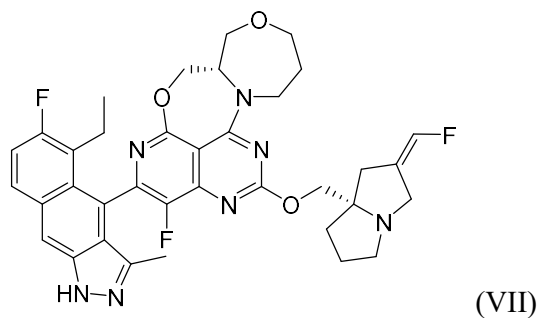
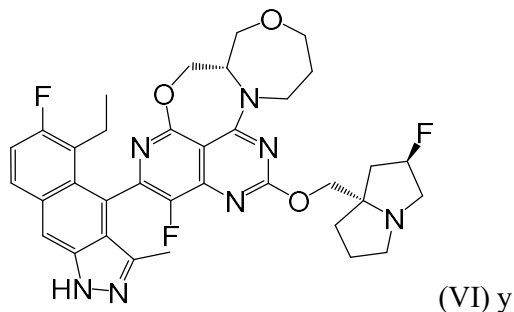
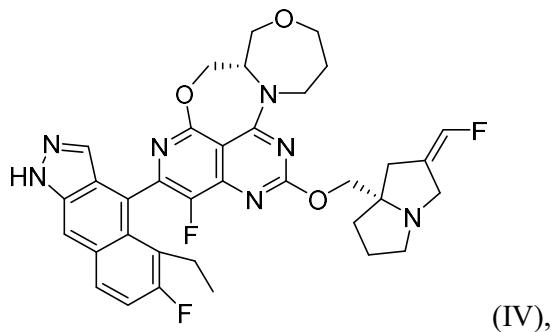




y sus sales farmacéuticamente aceptables, puede modular la actividad de KRAS y, por lo tanto, afectar a la vía de señalización que regula el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celulares asociados a trastornos oncológicos. En determinadas realizaciones, los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden inhibir las proteínas KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V, KRAS-G13D y/o KRAS TS. La divulgación proporciona además procesos para preparar compuestos de las Fórmulas (I)-(VII), métodos para usar dichos compuestos para tratar trastornos oncológicos y composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de las Fórmulas (I)-(VII).

[0008] La presente divulgación también proporciona inhibidores de molécula pequeña que modulan proteínas KRAS mutantes y TS y pueden ser compuestos farmacéuticamente activos valiosos para el tratamiento del cáncer. En algunas realizaciones, los compuestos divulgados inhiben selectivamente las proteínas KRAS-G12C, KRAS-G12D y/o KRAS-G12V. Los compuestos de las Fórmulas (III), (IV), (VI) y (VII):





y sus sales farmacéuticamente aceptables, puede modular la actividad de KRAS y, por lo tanto, afectar a la vía de señalización que regula el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celulares asociados a trastornos oncológicos. En determinadas realizaciones, los compuestos de las Fórmulas (III), (IV), (VI) y (VII) pueden inhibir las proteínas KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V, KRAS-G13D y/o KRAS TS. La divulgación proporciona además procesos para preparar compuestos de las Fórmulas (III), (IV), (VI) y (VII), métodos para usar dichos compuestos para tratar trastornos oncológicos y composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de las Fórmulas (III), (IV), (VI) y (VII).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009] La FIG. 1 es una representación gráfica que muestra un estudio de PKPD con respecto al Ej. 1.

[0010] La FIG. 2 es una representación gráfica que muestra un estudio de PKPD con respecto al Ej. 2.

[0011] La FIG. 3 es una representación gráfica que muestra un estudio de PKPD con respecto al Ej. 6.

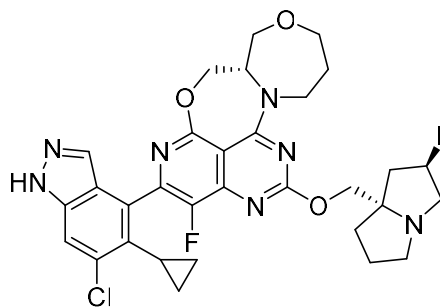
[0012] La FIG. 4 es una representación gráfica que muestra un estudio de eficacia de 14 días con respecto al Ej. 2.

[0013] La FIG. 5 es una representación gráfica que muestra un estudio de eficacia de 14 días con respecto al Ej. 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

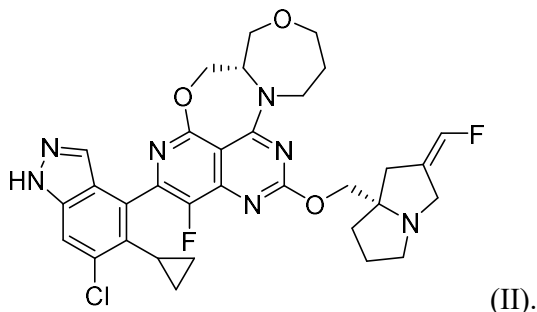
Compuestos de la divulgación

[0014] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se

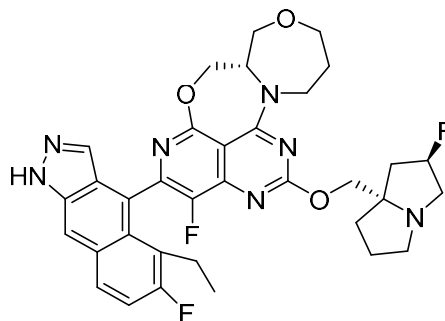


ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es (I).

[0015] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es

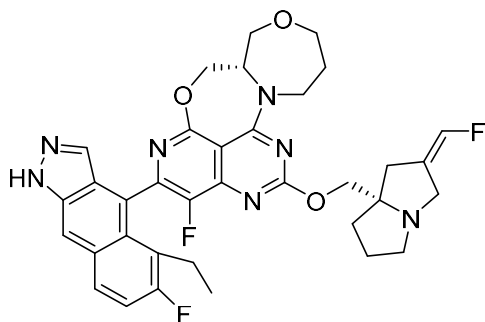


[0016] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se



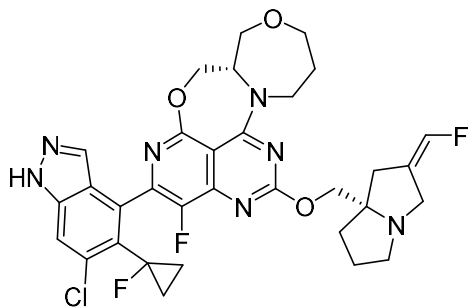
ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es (III).

[0017] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



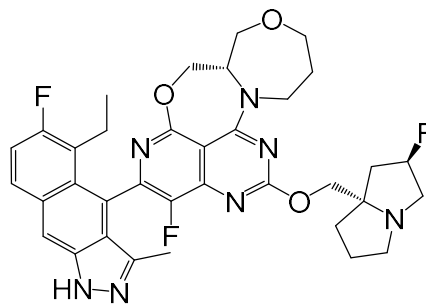
(IV).

[0018] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



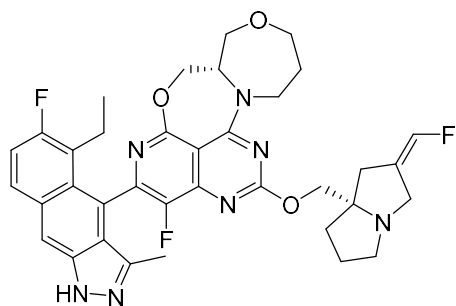
(V).

[0019] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se



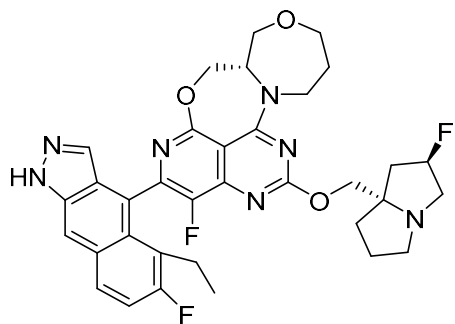
ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es
(VI).

[0020] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



(VII).

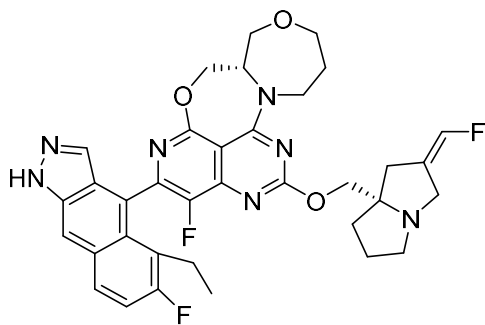
[0021] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (III), (IV), (VI) y (VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



(III).

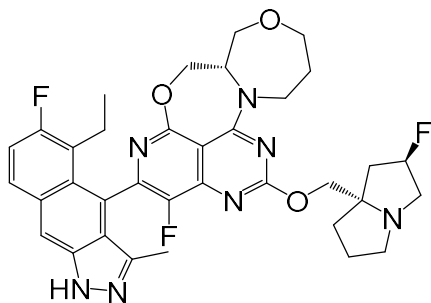
[0022] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (III), (IV), (VI) y (VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



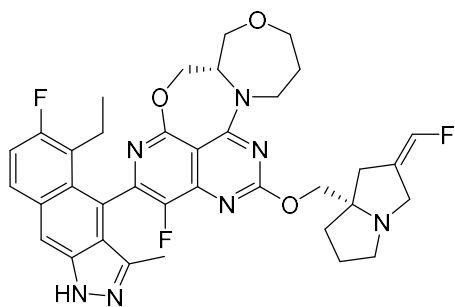
(IV).

[0023] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (III), (IV), (VI) y (VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



(VI).

[0024] En una realización, la presente divulgación proporciona un compuesto que tiene las Fórmulas estructurales (III), (IV), (VI) y (VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se ha mostrado anteriormente, en donde el compuesto es



(VII).

[0025] En realizaciones específicas, la presente divulgación proporciona un compuesto como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1-7 que se exponen a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0026] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos que tienen dosis humanas orales predichas bajas que son resultado de propiedades farmacodinámicas superiores (por ejemplo, como se demuestra en el modelo en ratón de xenoinjerto AsPC-1 medido como inhibición de fosfo-ERK tumoral) y propiedades

farmacocinéticas preclínicas superiores con exposición oral preferible (por ejemplo, como se determina en rata, perro y macaco de la India).

[0027] La presente divulgación incluye las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos definidos en el presente documento, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de todas las fórmulas estructurales, realizaciones y clases definidas en el presente documento.

Definiciones

[0028] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención.

[0029] Como se usan a lo largo de la presente divulgación, "compuesto(s) de las Fórmulas (I)-(VII)", "compuesto(s) divulgado(s) en el presente documento", "compuesto(s) descrito(s) en el presente documento", "compuesto(s) de la divulgación", etc., se usan indistintamente y ha de entenderse que incluyen los compuestos divulgados de las Fórmulas (I)-(VII). Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden formar sales que también están dentro del alcance de la presente divulgación. Se entiende que la referencia a un compuesto de la divulgación (o compuesto de las Fórmulas (I)-(VII)) en el presente documento incluye la referencia a sales del mismo, a menos que se indique otra cosa.

[0030] La línea ondulada ~~~~ , como se usa en el presente documento, indica un punto de unión al compuesto que puede estar en forma E o Z.

[0031] Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, pueden aparecer como racematos y mezclas racémicas, enantiómeros individuales, mezclas diastereoisoméricas y diaestereoisómeros individuales. Los centros de asimetría que están presentes en los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden tener todos, independientemente entre sí, configuración S o configuración R. Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) incluir todos los posibles enantiómeros y diastereómeros y mezclas de dos o más estereoisómeros, por ejemplo, mezclas de enantiómeros y/o diastereómeros, en todas las relaciones. Por lo tanto, los enantiómeros son un objeto de la divulgación en forma enantioméricamente pura, antípodos tanto levógiras como dextrógiras, en forma de racematos y en forma de mezclas de los dos enantiómeros en todas las relaciones. En el caso de una isomería cis/trans, la divulgación incluye tanto la forma cis como la forma trans (y tanto la forma E como la forma Z), así como mezclas de estas formas en todas las relaciones. La presente divulgación pretende comprender todas

dichas formas estereoisoméricas de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII). Cuando una fórmula estructural o nombre químico especifica una configuración particular en un estereocentro, se prevé el enantiómero o estereoisómero del compuesto resultante de ese estereocentro especificado. Cuando una fórmula estructural de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) indica una línea recta en un centro quiral, la fórmula estructural incluye los estereoisómeros tanto S como R asociados al centro quiral y mezclas de los mismos.

[0032] Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden separarse en sus diastereoisómeros individuales por, por ejemplo, cristalización fraccionada en un disolvente adecuado, por ejemplo, metanol o acetato de etilo o una mezcla de los mismos, o por cromatografía quiral usando una fase estacionaria ópticamente activa. La stereoquímica absoluta se puede determinar por cristalografía de rayos X de los productos cristalinos o intermedios cristalinos que se derivatizan, en caso necesario, con un reactivo que contiene un centro asimétrico de configuración absoluta conocida. También puede usarse dicroísmo circular vibratorio (VCD) para determinar la stereoquímica absoluta. Como alternativa, puede obtenerse cualquier estereoisómero o isómeros de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) mediante síntesis estereoespecífica usando materiales de partida ópticamente puros o reactivos de configuración absoluta conocida.

[0033] Si se desea, las mezclas racémicas de los compuestos pueden separarse de forma que puedan aislarse los enantiómeros individuales. La separación puede realizarse mediante métodos bien conocidos en la materia, tales como el acoplamiento de una mezcla racémica de compuestos con un compuesto enantioméricamente puro para formar una mezcla diastereomérica, seguido de separación de los diastereómeros individuales mediante métodos convencionales, tales como cristalización fraccionada o cromatografía. La reacción de acoplamiento es con frecuencia la formación de sales usando un ácido o base enantioméricamente puros. Después, los derivados diastereoméricos pueden convertirse en los enantiómeros puros por escisión del resto quiral añadido. La mezcla racémica de los compuestos también puede separarse directamente mediante métodos cromatográficos utilizando fases estacionarias quirales, cuyos métodos se conocen bien en la técnica.

[0034] Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) que contienen dobles enlaces olefinicos, a menos que se especifique lo contrario, pretenden incluir los isómeros geométricos E y Z.

[0035] Algunos de los compuestos descritos en el presente documento pueden existir en forma de tautómeros que tienen diferentes puntos de unión de hidrógeno acompañados por uno o más desplazamientos de dobles enlaces. Por ejemplo, una cetona y su forma enólica

son tautómeros ceto-enol. Los tautómeros individuales, así como las mezclas de los mismos, se incluyen en los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII).

[0036] Algunos de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) descritos en el presente documento pueden existir como atropisómeros cuando la barrera de energía de rotación alrededor de un enlace simple es lo suficientemente alta como para evitar la rotación libre a una temperatura dada, permitiendo de este modo el aislamiento de conformeros individuales con propiedades distintas. Los atropisómeros individuales, así como las mezclas de los mismos, se incluyen con compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) de la presente divulgación. Cuando se resuelven, los atropisómeros individuales pueden designarse mediante convenciones establecidas, tales como las especificadas por las Recomendaciones de 2013 de la Unión Internacional de Química Aplicada Pura (IUPAC).

[0037] En los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII), los átomos pueden presentar sus abundancias isotópicas naturales o uno o más de los átomos pueden estar enriquecidos de forma artificial en un isótopo particular que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra predominantemente en la naturaleza. La presente divulgación, como se describe y se reivindica en el presente documento, pretende incluir todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y las realizaciones de los mismos. Por ejemplo, diferentes formas isotópicas de hidrógeno (H) incluyen protio (^1H) y deuterio (^2H , también indicado en el presente documento como D). El protio es el isótopo de hidrógeno predominante que se encuentra en la naturaleza. El enriquecimiento en deuterio puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas, tales como aumentar la semivida *in vivo* o reducir los requisitos de dosificación o puede proporcionar un compuesto útil como patrón para la caracterización de muestras biológicas. Los compuestos enriquecidos isotópicamente pueden prepararse sin experimentación excesiva mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia o mediante procesos análogos a los que se describen en los Esquemas y Ejemplos del presente documento usando reactivos y/o intermedios apropiados isotópicamente enriquecidos.

[0038] La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de bases o ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Cuando un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) es ácido, su sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de dichas bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre (cúprico y cuproso), férricas, ferrosas, litio, magnesio, manganeso

(manganesico y manganoso), potasio, sodio, cinc y sales similares. Se prefieren las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales preparadas a partir de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, aminas secundarias y terciarias derivadas tanto de fuentes naturales como sintéticas. Las bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables a partir de las cuales pueden formarse sales incluyen, por ejemplo, arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, dicitlohexilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

[0039] Cuando un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) es básico, su sal correspondiente puede prepararse convenientemente a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Dichos ácidos incluyen, por ejemplo, acético, bencenosulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mícico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenosulfónico y similares. Se prefieren los ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico. Si un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) contiene simultáneamente grupos ácidos y básicos en la molécula, la divulgación también incluye, además de las formas de sal mencionadas, sales internas o betaínas (zwitteriones). Las sales pueden obtenerse a partir de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) mediante métodos habituales conocidos por un experto en la materia, por ejemplo, mediante combinación con un ácido o una base orgánicos o inorgánicos en un disolvente o dispersante, o mediante intercambio aniónico o catiónico de otras sales. La presente divulgación también incluye todas las sales de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) que, debido a su baja compatibilidad fisiológica, no son directamente adecuados para su uso en productos farmacéuticos, pero que pueden usarse, por ejemplo, como intermedios para reacciones químicas o para la preparación de sales farmacéuticamente aceptables.

[0040] Además, los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden existir en forma amorfa y/o una o más formas cristalinas y como tales todas las formas amorfas y cristalinas y mezclas de las mismas de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII), incluyendo los Ejemplos, pretenden incluirse dentro del alcance de la presente divulgación. Además, algunos de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden formar solvatos con agua (es

decir, un hidrato) o disolventes orgánicos comunes tales como, pero sin limitación, acetato de etilo. Dichos solvatos e hidratos, particularmente los solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables, de los presentes compuestos se incluyen análogamente dentro del alcance de la presente divulgación, junto con las formas anhidras y no solvatadas.

[0041] Cualquier modificación de profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) que dé como resultado la conversión *in vivo* en un compuesto dentro del alcance de la presente divulgación también está dentro del alcance de la presente divulgación.

[0042] Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz (o efectiva)" y descripciones similares tales como "una cantidad eficaz para el tratamiento" o "una dosis eficaz" se refieren a la cantidad de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) que desencadenará la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro facultativo. En una realización preferida, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) que alivia al menos un síntoma clínico en un paciente humano. La expresión "cantidad profilácticamente eficaz (o efectiva)" y descripciones tales como "una cantidad eficaz para la prevención" se refieren a la cantidad de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) que prevendrá o reducirá el riesgo de aparición del evento biológico o médico que se pretende prevenir en un tejido, un sistema, animal o ser humano por un investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

Dosificaciones de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII)

[0043] La pauta posológica que utiliza un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) se selecciona de acuerdo con una diversidad de factores, incluyendo el tipo, la especie, la edad, el peso, el sexo y el estado médico del paciente; la gravedad de la afección que ha de tratarse; la potencia del compuesto elegido para administrarse; la vía de administración; y la función renal y hepática del paciente. Una consideración de estos factores está dentro del alcance del médico experto con el fin de determinar la cantidad de dosis terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz necesaria para prevenir, contrarrestar o detener la evolución de la afección. Se entiende que una cantidad de dosis diaria específica puede ser simultáneamente una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para el tratamiento de una afección oncológica, y una cantidad profilácticamente eficaz, por ejemplo, para la prevención de una afección oncológica.

[0044] Aunque las necesidades individuales varían, la determinación de los intervalos óptimos de cantidades eficaces de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) está dentro del conocimiento de la técnica. Para la administración a un ser humano, por ejemplo, en el tratamiento curativo o profiláctico de las afecciones y trastornos identificados en el presente documento, las dosis típicas de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden ser de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día, o al menos 0,05 mg/kg, o al menos 0,08 mg/kg, o al menos 0,1 mg/kg, o al menos 0,2 mg/kg, o al menos 0,3 mg/kg, o al menos 0,4 mg/kg, o al menos 0,5 mg/kg, y cualquier cantidad intermedia, a aproximadamente 50 mg/kg o menos, o aproximadamente 40 mg/kg o menos, o aproximadamente 30 mg/kg o menos, o aproximadamente 20 mg/kg o menos, o aproximadamente 10 mg/kg o menos y cualquier cantidad intermedia, que puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 2,5 mg/día (0,5 mg/kg x 5 kg) a aproximadamente 5000 mg/día (50 mg/kg x 100 kg). Por ejemplo, las dosis de los compuestos pueden ser de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 50 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 3 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,07 mg/kg/día a aproximadamente 3 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,09 mg/kg/día a aproximadamente 3 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,05 mg/kg/día a aproximadamente 0,1 mg/kg/día, o de aproximadamente 0,1 mg/kg/día a aproximadamente 1 mg/kg/día, o de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 10 mg/kg/día, o de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 5 mg/kg/día, o de aproximadamente 1 mg/kg/día a aproximadamente 3 mg/kg/día, o de aproximadamente 3 mg/día a aproximadamente 500 mg/día, o de aproximadamente 5 mg/día a aproximadamente 250 mg/día, o de aproximadamente 10 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, o de aproximadamente 3 mg/día a aproximadamente 10 mg/día, o de aproximadamente 100 mg/día a aproximadamente 250 mg/día. Dichas dosis pueden administrarse en una sola dosis o pueden dividirse en múltiples dosis.

Composiciones farmacéuticas

[0045] Los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden administrarse a animales, preferentemente a mamíferos, y en particular a seres humanos, como productos farmacéuticos por sí mismos, en mezclas con otros o en forma de composiciones farmacéuticas. El término "sujeto" o "paciente" incluye animales, preferentemente mamíferos y especialmente seres humanos, que usan los presentes agentes

activos para la prevención o el tratamiento de una afección médica. La administración del fármaco al sujeto incluye la autoadministración y la administración al paciente por otra persona. El sujeto puede necesitar, o desear, el tratamiento para una enfermedad o afección médica existente, o puede necesitar o desear un tratamiento profiláctico para prevenir o reducir el riesgo de aparición de dicha enfermedad o afección médica. Como se usa en el presente documento, un sujeto "que necesita" tratamiento de una afección existente o tratamiento profiláctico incluye tanto la determinación de la necesidad por parte de un profesional médico como el deseo del paciente de dicho tratamiento.

[0046] Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso como productos farmacéuticos, su uso para modular la actividad de proteínas mutantes y/o KRAS TS y, en particular, su uso en la terapia y la profilaxis de las enfermedades o trastornos que se mencionan a continuación, así como su uso para la preparación de medicamentos para estos fines. En determinadas realizaciones, los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y sus sales farmacéuticamente aceptables inhiben las proteínas KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D.

[0047] Además, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden como componente activo una dosis eficaz de al menos un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable habitual, es decir, una o más sustancias portadoras y/o aditivos farmacéuticamente aceptables.

[0048] Por lo tanto, la presente divulgación proporciona, por ejemplo, dicho compuesto y sus sales farmacéuticamente aceptables para su uso como composiciones farmacéuticas que comprenden como componente activo una dosis eficaz de al menos un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable habitual, y los usos de dicho compuesto y/o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la terapia o profilaxis de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente, por ejemplo, cáncer, así como su uso para preparar medicamentos para estos fines.

[0049] Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación pueden administrarse por vía oral, por ejemplo, en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos laqueados, comprimidos recubiertos con azúcar, gránulos, cápsulas de gelatina dura y blanda, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones, o por vía rectal, por ejemplo, en forma de supositorios. La administración también puede

realizarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, por vía intramuscular o por vía intravenosa en forma de soluciones para inyección o infusión.

[0050] Otras formas de administración adecuadas son, por ejemplo, administración percutánea o tópica, por ejemplo, en forma de pomadas, tinturas, pulverizaciones o sistemas terapéuticos transdérmicos, o, por ejemplo, microcápsulas, implantes o barras. La forma de administración preferida depende, por ejemplo, de la enfermedad que ha de tratarse y de su gravedad.

[0051] La cantidad de compuesto activo de un compuesto descrito en el presente documento y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en la composición farmacéutica normalmente es de 0,01 a 200 mg, o de 0,1 a 200 mg, o de 1 a 200 mg, por dosis, pero dependiendo del tipo de la composición farmacéutica, también puede ser superior. En algunas realizaciones, la cantidad de compuesto activo de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y/o sus sales farmacéuticamente aceptables en la composición farmacéutica es de 0,01 a 10 mg por dosis. Las composiciones farmacéuticas por lo general comprenden del 0,5 al 90 por ciento en peso de al menos un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y/o sus sales farmacéuticamente aceptables. La preparación de las composiciones farmacéuticas puede realizarse de una manera conocida en sí. Para este fin, uno o más compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y/o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con una o más sustancias portadoras farmacéuticas sólidas o líquidas y/o aditivos (o sustancias auxiliares) y, si se desea, en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos que tienen acción terapéutica o profiláctica, se llevan a una forma de administración o forma farmacéutica adecuada que después puede usarse como un producto farmacéutico en medicina humana o veterinaria.

[0052] Para la producción de píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos con azúcar y cápsulas de gelatina dura, resulta posible usar, por ejemplo, lactosa, almidón, por ejemplo, almidón de maíz o derivados de almidón, talco, ácido esteárico o sus sales, etc. Son portadores para cápsulas de gelatina y supositorios, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc. Son portadores adecuados para la preparación de soluciones, por ejemplo, de soluciones para inyección, emulsiones o jarabes, por ejemplo, agua, solución de cloruro de sodio fisiológicamente aceptable, alcoholes tales como etanol, glicerol, polioles, sacarosa, azúcar invertida, glucosa, manitol, aceites vegetales, etc. También es posible liofilizar los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) y sus sales farmacéuticamente aceptables y usar los liofilizados resultantes, por ejemplo, para preparar preparaciones para inyección o infusión. Son portadores adecuados para

microcápsulas, implantes o barras, por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

[0053] Además de los compuestos activos y portadores, las composiciones farmacéuticas también pueden contener aditivos habituales, por ejemplo, cargas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, estabilizantes, emulsionantes, dispersantes, conservantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, aromatizantes, espesantes, diluyentes, sustancias tamponantes, disolventes, solubilizantes, agentes para conseguir un efecto de depósito, sales para alterar la presión osmótica, agentes de recubrimiento y/o antioxidantes.

Métodos de uso de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII)

[0054] La presente solicitud proporciona un método de inhibición de la señalización celular mediada por RAS que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La inhibición de la transducción de señales mediada por RAS puede evaluarse y demostrarse mediante una amplia diversidad de formas conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen (a) una disminución en la actividad GTPasa de RAS; (b) una disminución en la afinidad de unión a GTP o un aumento en la afinidad de unión a GDP; (c) un aumento en Kdisociación de GTP o una disminución en Kdisociación de GDP; (d) una disminución en los niveles de moléculas de transducción de señalización corriente abajo en la vía de RAS, tal como una disminución en los niveles de pMEK, pERK o pAKT; y/o (e) una disminución en la unión del complejo RAS a moléculas de señalización corriente abajo que incluyen, pero sin limitación, Raf. Pueden usarse kits y ensayos disponibles en el mercado para determinar uno o más de los anteriores.

[0055] La presente solicitud también proporciona métodos de uso de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) (o sus sales farmacéuticamente aceptables) o composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos para tratar patologías, incluyendo, pero sin limitación, afecciones con implicación de proteínas KRAS mutantes y/o amplificación o sobreexpresión de proteína KRAS TS (por ejemplo, cáncer) y, en algunas realizaciones, los mutantes KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D.

[0056] En algunas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) o cualquiera de las composiciones farmacéuticas anteriores que comprenden un compuesto de este tipo a un sujeto que necesite dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el cáncer está

mediado por una mutación de KRAS, por ejemplo, las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D. En diversas realizaciones, el cáncer es cáncer de páncreas, cáncer colorrectal o cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de vesícula biliar, cáncer de tiroides o cáncer de vías biliares.

[0057] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto que lo necesita, en donde dicho método comprende determinar si el sujeto tiene una mutación de KRAS (por ejemplo, las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D) y determinar si el sujeto tiene la mutación de KRAS, después administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0058] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno en un sujeto que lo necesita, en donde dicho método comprende determinar si el sujeto tiene una expresión amplificada y/o sobreexpresión de la proteína KRAS TS y determinar si el sujeto tiene dichas características, después administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0059] Los compuestos divulgados inhiben el crecimiento celular independiente del anclaje y, por lo tanto, tienen el potencial de inhibir la metástasis tumoral. En consecuencia, otra realización de la presente divulgación proporciona un método para inhibir la metástasis tumoral, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII).

[0060] También se han identificado mutaciones de KRAS en neoplasias hemáticas (por ejemplo, cánceres que afectan a la sangre, la médula ósea y/o los ganglios linfáticos). En consecuencia, determinadas realizaciones se refieren a la administración de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) (por ejemplo, en forma de una composición farmacéutica) a un sujeto que necesita tratamiento de una neoplasia maligna hemática. Dichas neoplasias malignas incluyen, pero sin limitación, leucemias y linfomas. Por ejemplo, los compuestos divulgados actualmente pueden usarse para el tratamiento de enfermedades tales como leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma linfocítico pequeño (LLP), leucemia mielógena crónica (CML), leucemia monocítica aguda (LMoA) y/u otras leucemias. En otras realizaciones, los compuestos son útiles para el tratamiento de linfomas tales como linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin. En diversas realizaciones, los compuestos son útiles para el

tratamiento de neoplasias malignas de células plasmáticas tales como mieloma múltiple, linfoma de células del manto y macroglobulinemia de Waldenström.

[0061] La determinación de si un tumor o cáncer comprende una mutación de KRAS (por ejemplo, las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D y/o KRAS-G12V) o KRAS TS pueden realizarse evaluando la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína KRAS, evaluando la secuencia de aminoácidos de la proteína KRAS, o evaluando las características de un supuesto mutante de KRAS o proteína KRAS TS. La secuencia de KRAS humana de tipo silvestre se conoce en la técnica.

[0062] Los expertos en la materia también conocen métodos para detectar una mutación en una secuencia de nucleótidos de KRAS o una secuencia de nucleótidos de KRAS TS. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción por reacción en cadena de la polimerasa (PCR-RFLP), ensayos de polimorfismo de conformación de cadena única por reacción en cadena de la polimerasa (PCR-SSCP), ensayos de PCR en tiempo real, secuenciación por PCR, ensayos de amplificación por PCR específica de alelo mutante (MASA), secuenciación directa, reacciones de extensión cebador, electroforesis, ensayos de ligadura de oligonucleótidos, ensayos de hibridación, ensayos TaqMan, ensayos de genotipado de SNP, ensayos de fusión de alta resolución y análisis de micromatrices. En algunas realizaciones, las muestras se evalúan para detectar mutaciones de KRAS (por ejemplo, las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D) mediante PCR en tiempo real. En la PCR en tiempo real, se usan sondas fluorescentes específicas para la mutación de KRAS. Cuando hay presente una mutación, la sonda se une y se detecta fluorescencia. En algunas realizaciones, la mutación de KRAS se identifica usando un método de secuenciación directa de regiones específicas (por ejemplo, exón 2 y/o exón 3) en el gen de KRAS.

[0063] Los expertos en la materia conocen métodos para detectar una mutación en una proteína KRAS o una proteína KRAS TS (por ejemplo, las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V, KRAS-G13D). Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la detección de un mutante de KRAS o proteína KRAS TS usando un agente de unión (por ejemplo, un anticuerpo) específico para la proteína mutante o TS, electroforesis de proteínas y transferencia de Western, y secuenciación directa de péptidos.

[0064] Puede evaluarse una serie de muestras de tejido para determinar si un tumor o cáncer comprende una mutación de KRAS (por ejemplo, las mutaciones de KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D) o KRAS TS amplificada/sobreexpresada. En algunas realizaciones, la muestra se toma de un sujeto que tiene un tumor o cáncer. En

algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor/cáncer fresca. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de tumor/cáncer congelada. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra fijada en parafina y embebida en formol. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de células tumorales circulantes (CTC). En algunas realizaciones, la muestra se procesa a un lisado celular. En algunas realizaciones, la muestra se procesa para obtener ADN o ARN.

[0065] La presente solicitud también proporciona un método de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto que lo necesita. En algunas realizaciones, dicho método se refiere al tratamiento de un sujeto que padece un cáncer tal como leucemia mieloide aguda, cáncer en adolescentes, carcinoma adrenocortical de la infancia, cánceres relacionados con el SIDA (por ejemplo, linfoma y sarcoma de Kaposi), cáncer de ano, cáncer de apéndice, astrocitomas, teratoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, glioma del tronco encefálico, tumor cerebral, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, teratoide atípico, tumores embrionarios, tumor de células germinales, linfoma primario, cáncer de cuello de útero, cánceres de la infancia, cordoma, tumores cardíacos, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (CML), trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, cáncer colorrectal, craneofaringioma, linfoma cutáneo de linfocitos T, carcinoma ductal *in situ* (CDIS) extrahepático, tumores embrionarios, cáncer del SNC, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer de esófago, estesioblastoma, sarcoma de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer ocular, histiocitoma fibroso de hueso, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores estromáticos gastrointestinales (TEGI), tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, tricoleucemia, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cardíaco, cáncer de hígado, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, tumores de células de los islotes, tumores neuroendocrinos pancreáticos, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer de hígado, carcinoma lobular *in situ* (CLIS), cáncer de pulmón, linfoma, cáncer escamoso metastásico de cuello con tumor primario oculto, carcinoma del tracto de la línea media, cáncer de boca; síndromes múltiples de neoplasia endocrina, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, micosis fungoide, síndromes de mielodisplasia, neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas, mieloma múltiple, carcinoma de células de Merkel,

mesotelioma maligno, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), cancer oral, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, papilomatosis, paraganglioma, cáncer del seno paranasal y de la cavidad nasal, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central (SNC), cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células transicionales, retinoblastoma, rabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de piel, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de pulmón microcítico; cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, linfoma de linfocitos T, cáncer de testículo, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y el uréter, tumor trofoblástico, cánceres inusuales de la infancia, cáncer de uretra, sarcoma uterino, cáncer de vagina, cáncer de vulva o cáncer inducido por virus. En algunas realizaciones, dicho método se refiere al tratamiento de un trastorno hiperproliferativo no canceroso, tal como hiperplasia benigna de la piel (por ejemplo, psoriasis), reestenosis o próstata (por ejemplo, hipertrofia prostática benigna (HPB)).

[0066] En algunas realizaciones, los métodos de tratamiento se refieren al tratamiento de cánceres de pulmón y los métodos comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) (o una composición farmacéutica que comprende dichos compuestos) a un sujeto que lo necesita. En determinadas realizaciones, el cáncer de pulmón es un carcinoma pulmonar no microcítico (CPNM), por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de pulmón escamocelular o carcinoma de pulmón macrocítico. En algunas realizaciones, el cáncer de pulmón es un carcinoma de pulmón microcítico. Otros cánceres de pulmón para los que los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) pueden proporcionar un beneficio terapéutico incluyen, pero sin limitación, tumores glandulares, tumores carcinoides y carcinomas indiferenciados.

[0067] La presente divulgación también proporciona métodos de modulación de la actividad de una proteína KRAS mutante (por ejemplo, actividad resultante de las mutaciones KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D) o la actividad de una proteína KRAS TS poniendo en contacto la proteína con una cantidad eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII). La modulación puede ser inhibir o activar la actividad de la proteína. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de inhibición de la actividad de la proteína poniendo en contacto la proteína KRAS mutante (por ejemplo, mutantes KRAS-G12C, KRAS-G12D, KRAS-G12V y/o KRAS-G13D) o

proteína KRAS TS con una cantidad eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) en solución. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de inhibición de la actividad de la proteína KRAS mutante o TS poniendo en contacto una célula, tejido u órgano que expresa la proteína de interés. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona métodos de inhibición de la actividad de la proteína en sujetos incluyendo, pero sin limitación, roedores y mamíferos (por ejemplo, seres humanos) mediante la administración a los sujetos de una cantidad eficaz de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII).

Terapias de combinación

[0068] Pueden administrarse uno o más agentes farmacológicamente activos adicionales en combinación con un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). Por agente (o agentes) activo adicional se entiende un agente (o agentes) farmacéuticamente activo en el organismo, incluyendo profármacos que se convierten en una forma farmacéuticamente activa después de la administración, que son diferentes del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII). Los agentes activos adicionales también incluyen el ácido libre, la base libre y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos agentes activos adicionales. Generalmente, puede usarse cualquier agente o agentes activos adicionales adecuados, incluyendo agentes quimioterápicos o anticuerpos terapéuticos, en cualquier combinación con el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) en una formulación de dosificación única (por ejemplo, una combinación farmacológica de dosis fija), o en una o más formulaciones de dosificación separadas que permitan la administración simultánea o secuencial de los agentes activos (coadministración de los agentes activos separados) a los sujetos. Además, los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) (o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) pueden administrarse en combinación con radioterapia, terapia hormonal, cirugía o inmunoterapia.

[0069] La presente solicitud también proporciona métodos para terapias de combinación en las que se sabe que el agente activo adicional modula otras vías, u otros componentes de la misma vía, o incluso conjuntos superpuestos de enzimas diana que se usan en combinación con un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, dicha terapia incluye, pero sin limitación, la combinación de uno o más compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) con agentes quimioterápicos, agentes inmunoterápicos, agentes hormonales y antihormonales, agentes de terapia dirigida y agentes antiangiogénicos, para proporcionar un efecto terapéutico sinérgico o aditivo. En

otra realización, dicha terapia incluye tratamiento por radiación para proporcionar un efecto terapéutico sinérgico o aditivo.

[0070] Los ejemplos de agentes activos adicionales (es decir, agentes antineoplásicos adicionales) incluyen agentes quimioterápicos (por ejemplo, agentes citotóxicos), agentes inmunoterápicos, agentes hormonales y antihormonales, agentes de terapia dirigida y agentes antiangiogénicos. Muchos agentes antineoplásicos pueden clasificarse dentro de uno o más de estos grupos. Aunque determinados agentes antineoplásicos se han categorizado dentro de uno o más grupos o subgrupos específicos en el presente documento, muchos de estos agentes también pueden enumerarse dentro de uno o más grupos o subgrupos, como se entendería actualmente en la técnica. Ha de entenderse que la clasificación del presente documento de un agente particular en un grupo particular no pretende ser limitante. Actualmente se conocen en la técnica muchos agentes antineoplásicos y pueden usarse en combinación con los compuestos de la presente divulgación.

[0071] Además, un agente puede ser un agonista, antagonista, modulador alostérico, toxina o, de manera más general, puede actuar para inhibir o estimular su diana (por ejemplo, activación o inhibición de receptor o enzima). Por ejemplo, son adecuados para su uso uno o más agentes (por ejemplo, anticuerpos, regiones de unión a antígeno o receptores solubles) que se unen específicamente e inhiben la actividad de los factores de crecimiento, tales como antagonistas del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, también conocido como factor de dispersión) y anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente a su receptor "c-met".

[0072] En una realización, el agente antineoplásico adicional es un agente quimioterápico, un agente inmunoterápico, un agente hormonal, un agente antihormonal, un agente de terapia dirigida o un agente antiangiogénico (o inhibidor de la angiogénesis). En una realización, el agente antineoplásico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agente quimioterápico, un inhibidor mitótico, un alcaloide vegetal, un agente alquilante, un antimetabolito, un análogo de platino, una enzima, un inhibidor de topoisomerasa, un retinoide, una aziridina, un antibiótico, un agente hormonal, un agente antihormonal, un antiestrógeno, un antiandrógeno, un antiadrenal, un andrógeno, un agente de terapia dirigida, un agente inmunoterápico, un modificador de la respuesta biológica, un inhibidor de citocinas, una vacuna contra tumores, un anticuerpo monoclonal, un inhibidor de punto de control inmunitario, un agente anti-PD-1, un agente anti-PD-L1, un factor estimulante de colonias, un inmunomodulador, una imida inmunomoduladora (IMiD), un agente anti-

CTLA4, un agente anti-LAG1, un agente anti-LAG3, un agente anti-ILT4, un agente anti-OX40, un agonista de GITR, un linfocito T-CAR, un BiTE, un inhibidor de la transducción de señales, un inhibidor del factor de crecimiento, un inhibidor de tirosina cinasa, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de histona desacetilasa (HDAC, por sus siglas en inglés), un inhibidor del proteasoma, un inhibidor del ciclo celular, un agente antiangiogénico, un inhibidor de la metaloproteasa de matriz (MMP), un inhibidor del factor de crecimiento de hepatocitos, un inhibidor de TOR, un inhibidor de KDR, un inhibidor de VEGF, un inhibidor de HIF-1 α , un inhibidor de HIF-2 α , un inhibidor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), un inhibidor de RAF, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK, un inhibidor de PI3K, un inhibidor de AKT, un inhibidor de MCL-1, un inhibidor de BCL-2, un inhibidor de SHP2, un inhibidor de HER-2, un inhibidor de BRAF, un modulador de la expresión génica, un inhibidor de la autofagia, un inductor de la apoptosis, un agente antiproliferativo y un inhibidor de la glucólisis.

[0073] En una realización, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales son un agente quimioterápico. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterápicos incluyen inhibidores mitóticos y alcaloides vegetales, agentes alquilantes, antimetabolitos, análogos de platino, enzimas, inhibidores de topoisomerasas, retinoides, aziridinas y antibióticos.

[0074] Los ejemplos no limitantes de inhibidores mitóticos y alcaloides vegetales incluyen taxanos tales como cabazitaxel, docetaxel, larotaxel, ortataxel, paclitaxel y tesetaxel; demecolcina; epotilona; eribulina; etopósido (VP- 16); fosfato de etopósido; navelbina; noscapina; tenipósido; taliblastina; vinblastina; vincristina; vindesina; vinflunina; y vinorelbina.

[0075] Los ejemplos no limitantes de agentes alquilantes incluyen mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, citofosfano, estramustina, ifosfamida, mannomustina, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, tris(2-cloroetil)amina, trofosfamida y mostaza de uracilo; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, estreptozotocina y TA-07; etileniminas y metilamelaminas tales como altretamina, tiotepa, trietilenmelamina, trietilentiofosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; ambamustina; bendamustina; dacarbazina; etoglúcido; irofulveno; mafosfamida; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; procarbazona; temozolomida; treosulfano; y triazicuona.

[0076] Los ejemplos no limitantes de antimetabolitos incluyen análogos de ácido fólico tales como aminopterina, denopterina, edatrexato, metotrexato, pteropterina, raltitrexed y trimetrexato; análogos de purina tales como 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, forodesina, tiamiprina y tioguanina; análogos de pirimidina tales como 5-fluorouracilo (5-FU), 6-azauridina, ancitabina, azacitidina, capecitabina, carmofur, citarabina, decitabina, didesoxiuridina, doxifluridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, galocitabina, gemcitabina y sapacitabina; 3-aminopiridina-2-carboxaldehído tiosemicarbazona; broxuridina; cladribina; ciclofosfamida; citarabina; emitefur; hidroxiurea; mercaptopurina; nelarabina; pemetrexed; pentostatina; tegafur; y troxacitabina.

[0077] Los ejemplos no limitantes de análogos de platino incluyen carboplatino, cisplatino, dicicloplatino, heptaplatino, lobaplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino y tetranitrato de triplatino.

[0078] Los ejemplos no limitantes de enzimas incluyen asparaginasa y pegaspargasa.

[0079] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la topoisomerasa incluyen acridina carboxamida, amonafida, amsacrina, belotecán, acetato de eliptinio, exatecán, indolocarbazol, irinotecán, lurtotecán, mitoxantrona, razoxano, rubitecán, SN-38, sobuzoxano y topotecán.

[0080] Los ejemplos no limitantes de retinoides incluyen alitretinoína, bexaroteno, fenretinida, isotretinoína, liarozol, retinamida RII y tretinoína.

[0081] Los ejemplos no limitantes de aziridinas incluyen benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa.

[0082] Los ejemplos no limitantes de antibióticos incluyen antibióticos intercalantes; antracenodionas; antibióticos de antraciclina tales como aclarubicina, amrrubicina, daunomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, menogarilo, nogalamicina, pirarrubicinay valrrubicina; 6-diazo-5-oxo-L-norleucina; aclacinomisinas; actinomicina; autramicina; azaserina; bleomicinas; cactinomicina; caliqueamicina; carabicina; carminomicina; carzinofilina; cromomicinas; dactinomicina; detorrubicin; esorrubicin; esperamicinas; geldanamicina; marcelomicina; mitomicinas; mitomicina C; ácido micofenólico; olivomicinas; novantrona; peplomicina; porfiromicina; potfiromicina; puromicina; quelamicina; rebecamicina; rodorrubicin; estreptonigrina; estreptozocina; *tanespimicina*; tubercidina; ubenimex; zinostatina; estimalámero de zinostatina; y zorrubicina.

[0083] En una realización, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales son un agente hormonal y/o antihormonal (es decir, terapia hormonal). Los ejemplos no limitantes de

agentes hormonales y antihormonales incluyen antiandrógenos tales como abiraterona, apalutamida, bicalutamida, darolutamida, enzalutamida, flutamida, goserelina, leuprolida y nilutamida; antiestrógenos tales como 4-hidroxitamoxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, EM-800, fosfestrol, fulvestrant, keoxifeno, LY 117018, onapristono, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno y trioxifeno; fármacos anti-adrenales tales como aminoglutetimida, dexaminoglutetimida, mitotano y trilostano; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano y testolactona; abarelix; anastrozol; cetorelix; deslorelina; exemestano; fadrozol; finasterida; formestano; histrelina (RL 0903); gonadotropina coriónica humana; lanreótido; LDI 200 (Milkhaus); letrozol; leuprorelina; mifepristona; nafarelina; nafoxidina; osaterona; prednisona; tiotropina alfa; y triptorelina.

[0084] En una realización, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales son un agente inmunoterápico (es decir, inmunoterapia). Los ejemplos no limitantes de agentes inmunoterápicos incluyen modificadores de la respuesta biológica, inhibidores de citocinas, vacunas contra tumores, anticuerpos monoclonales, inhibidores de punto de control inmunitario, factores estimulantes de colonias e inmunomoduladores.

[0085] Los ejemplos no limitantes de modificadores de la respuesta biológica, incluyendo inhibidores de citocinas (citocinas) tales como interferones e interleucinas, incluyen interferón alfa/interferón alfa tal como interferón alfa-2, interferón alfa-2a, interferón alfa-2b, interferón α -n1, interferón alfa-n3, interferón alfacon-1, peginterferón α -2a, peginterferón alfa-2b e interferón alfa leucocitario; interferón beta tal como interferón beta-1a e interferón beta-1b; interferón gamma tal como interferón gamma-1a natural e interferón gamma-1b; aldesleucina; interleucina-1 beta; interleucina-2; oprelvekina; sonermina; tasonermina; y virulizina.

[0086] Los ejemplos no limitantes de vacunas contra tumores incluyen APC 8015, AVICINE, vacuna contra el cáncer de vejiga, vacuna contra el cáncer (Biomira), inmunógeno de gastrina 17, vacuna de Maruyama, vacuna de lisado de melanoma, vacuna contra el oncolisado de melanoma (Colegio Médico de Nueva York), vacuna contra el melanoma (Universidad de Nueva York), vacuna contra el melanoma (Instituto Sloan Kettering), TICE® BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y vacuna de lisados de células de melanoma vírico (Hospital Royal Newcastle).

[0087] Los ejemplos no limitantes de anticuerpos monoclonales incluyen abagovomab, adecatumumab, aflibercept, alemtuzumab, blinatumomab, brentuximab vedotina, MAb contra CA 125 (Biomira), MAb contra el cáncer (Japan Pharmaceutical Development), daclizumab, daratumumab, denosumab, edrecolomab, gemtuzumab zogamicina, MAb

contra HER-2 y Fc (Medarex), ibritumomab tiuxetano, MAb contra 105AD7 idiopático (CRC Technology), MAb contra CEA idiopático (Trilex), ipilimumab, quavonlimab, vibostolimab, favezelimab, lintuzumab, MAb contra LYM-1-yodo 131 (Techni clone), mitumomab, moxetumomab, ofatumumab, MAb contra mucina epitelial polimórfica-itrio 90 (Antisoma), ranibizumab, rituximab y trastuzumab.

[0088] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de punto de control inmunitarios incluyen agentes anti-PD-1 o anticuerpos tales como cemiplimab, nivolumab y pembrolizumab; agentes anti-PD-L1 o anticuerpos tales como atezolizumab, avelumab y durvalumab; agentes o anticuerpos anti-CTLA-4 tales como ipilimumab y quavonlimab; agentes anti-LAG1; agentes anti-LAG3 tales como favezelimab y agentes anti-OX40.

[0089] Los ejemplos no limitantes de factores estimulantes de colonias incluyen darbepoetina alfa, epoetina alfa, epoetina beta, filgrastim, factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos, lenograstim, leridistim, mirimostim, molgramostim, nartograstim, pegfilgrastim y sargramostim.

[0090] Los ejemplos no limitantes de agentes inmunoterápicos adicionales incluyen BiTE, linfocitos T-CAR, agonistas de GTR, imiquimod, imidas inmunomoduladoras (IMiD), ARN bicatenario emparejado erróneamente (Ampligen), resiquimod, SRL 172 y timalfasina.

[0091] En una realización, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales es un agente de terapia dirigida (es decir, terapia dirigida). Los agentes de terapia dirigida incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y fármacos de molécula pequeña. Los ejemplos no limitantes de agentes de terapia dirigida incluyen inhibidores de transducción de señales, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores de tirosina cinasas, inhibidores de EGFR, inhibidores de histona desacetilasa (HDAC), inhibidores del proteasoma, inhibidores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la metaloproteasa de matriz (MMP), inhibidores del factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de TOR, inhibidores de KDR, inhibidores de VEGF, inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), inhibidores de MEK, inhibidores de ERK, inhibidores de PI3K, inhibidores de AKT, inhibidores de MCL-1, inhibidores de BCL-2, inhibidores de SHP2, inhibidores de HER-2, inhibidores de BRAF, inhibidores de BTK (por ejemplo, nembrotinib), moduladores de la expresión génica, inhibidores de la autofagia, inductores de apoptosis, agentes antiproliferativos e inhibidores de la glucólisis.

[0092] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de transducción de señales incluyen inhibidores de tirosina cinasas, inhibidores de cinasas múltiples, anlotinib, avapritinib,

axitinib, dasatinib, dovitinib, imatinib, lenvatinib, lonidamina, nilotinib, nintedanib, pazopanib, pegvisomant, ponatinib, vandetanib y agentes inhibidores del EGFR.

[0093] Los ejemplos no limitantes de agentes inhibidores del EGFR incluyen antagonistas de molécula pequeña de EGFR tales como afatinib, brigatinib, erlotinib, gefitinib, lapatinib y osimertinib; e inhibidores del EGFR basados en anticuerpos, incluyendo cualquier anticuerpo anti-EGFR o fragmento de anticuerpo que pueda bloquear parcial o totalmente la activación del EGFR por su ligando natural. Los agentes inhibidores del EGFR basados en anticuerpos pueden incluir, por ejemplo, aquellos descritos en Modjtahedi, H., *et al.*, 1993, *Br. J. Cancer* 67:247-253; Teramoto, T., *et al.*, 1996, *Cancer* 77:639-645; Goldstein *et al.*, 1995, *Clin. Cancer Res.* 1:1311-1318; Huang, S. M., *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59:1559(8):1935-40; y Yang, X., *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59:1236-1243; anticuerpo monoclonal Mab E7.6.3 (Yang, 1999 citado anteriormente); Mab C225 (N.º de acceso de ATCC HB-8508), o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene la especificidad de unión del mismo; nucleótido antisentido específico o ARNip; afatinib, cetuximab; matuzumab; necitumumab; nimotuzumab; panitumumab; y zalutumumab.

[0094] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) incluyen belinostat, panobinostat, romidepsina y vorinostat.

[0095] Los ejemplos no limitantes de inhibidores del proteasoma incluyen bortezomib, carfilzomib, ixazomib, marizomib (salinosporamida a) y oprozomib.

[0096] Los ejemplos no limitantes de inhibidores del ciclo celular, incluyendo inhibidores de CDK, incluyen abemaciclib, alvociclib, palbociclib y ribociclib.

[0097] En una realización, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales son un agente antiangiogénico (o inhibidor de la angiogénesis) incluyendo, pero sin limitación, inhibidores de la metaloproteasa de matriz (MMP); inhibidores de VEGF; inhibidores de EGFR; inhibidores de TOR tales como everolimus y temsirolimus; agentes inhibidores de la PDGFR cinasa tales como crenolanib; inhibidores de HIF-1 α tales como PX 478; inhibidores de HIF-2 α tales como belzutifán e inhibidores de HIF-2 α descritos en el documento WO 2015/035223; agentes inhibidores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o FGFR tales como B-FGF y RG 13577; inhibidores del factor de crecimiento de hepatocitos; inhibidores de KDR; agentes anti-Ang1 y anti-Ang2; agentes inhibidores de la anti-Tie2 cinasa; antagonistas de Tek (documento US 2003/0162712; documento US 6.413.932); agentes anti-TWEAK (documento US 6.727.225); dominio de distintegrina de ADAM para antagonizar la unión de integrina a sus ligandos (documento US 2002/0042368); anticuerpos anti-receptor de ef y/o anti-efrina o regiones de unión a

antígeno (documentos US 5.981.245; 5.728.813; 5.969.110; 6.596.852; 6.232.447; y 6.057.124); y antagonistas anti-PDGF-BB, así como anticuerpos o regiones de unión a antígeno que se unen específicamente a ligandos de PDGF-BB.

[0098] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de la metaloproteinasa de matriz (MMP) incluyen inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9), prinomastat, RO 32-3555 y RS 13-0830. Se describen ejemplos de inhibidores de metaloproteinasas de matriz útiles, por ejemplo, en los documentos WO 96/33172, WO 96/27583, EP 1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP 0606046, EP 0931788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO 1999/007675, EP 1786785, EP 1181017, US 2009/0012085, US 5863949, US 5.861.510 y EP 0780386. Son inhibidores de MMP-2 y MMP-9 preferidos aquellos que tienen poca o ninguna actividad de inhibición de MMP-1. Más preferentemente, son aquellos que inhiben selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 con respecto a las otras metaloproteinasas de matriz (es decir, MAP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13).

[0099] Los ejemplos no limitantes de agentes inhibidores de VEGF y VEGFR incluyen bevacizumab, cediranib, CEP 7055, CP 547632, KRN 633, orantinib, pazopanib, pegaptanib, pegaptanib octasódico, semaxanib, sorafenib, sunitinib, antagonista de VEGF (Boreau, Dinamarca) y VEGF-TRAP™.

[0100] El agente o agentes antineoplásicos adicionales también pueden ser otro agente antiangiogénico incluyendo, pero sin limitación, 2-metoxiestradiol, AE 941, alemtuzumab, Mab alfa-D148 (Amgen, EE. UU.), alfastatina, acetato de anecortavo, angiocidina, inhibidores de la angiogénesis, (SUGEN, EE. UU.), angiostatina, Mab anti-Vn (Crucell, Países Bajos), atiprimod, axitinib, AZD 9935, BAY RES 2690 (Bayer, Alemania, BC 1 (Instituto de Investigación del Cáncer de Génova, Italia), beloranib, benefina (Lane Labs, EE. UU.), cabozantinib, CDP 791 (Grupo Celltech, Reino Unido), condroitinasa AC, cilengitida, profármaco de combretastatina A4, CP 564959 (OSI, EE. UU.), CV247, CYC 381 (Universidad de Harvard, EE. UU.), E 7820, EHT 0101, endostatina, clorhidrato de enzastaurina, ER-68203-00 (IVAX, EE. UU.), fragmento de fibrinógeno-E, Flk-1 (ImClone Systems, EE. UU.), formas de FLT 1 (VEGFR 1), FR-111142, GCS-100, GW 2286 (GlaxoSmithKline, Reino Unido), IL-8, ilomastat, IM-862, irsogladina, KM-2550 (Kyowa Hakko, Japón), lenalidomida, lenvatinib, Mab alfa5beta3 integrina, segunda generación (Applied Molecular Evolution, EE. UU. y MedImmune, EE. UU.), Mab VEGF (Xenova, Reino Unido), marimastat, maspina (Sosei, Japón), metastatina, motuporamina C, M-PGA,

ombrabulina, OXI4503, PI 88, factor plaquetario 4, PPI 2458, ramucirumab, rBPI 21 y antiangiogénico derivado de BPI (XOMA, EE. UU.), regorafenib, SC-236, SD-7784 (Pfizer, EE. UU.), SDX 103 (Universidad de California en San Diego, EE. UU.), SG 292 (Telios, EE. UU.), SU-0879 (Pfizer, EE. UU.), TAN-1120, TBC-1635, tesevatinib, tetratiomolibdato, talidomida, inhibidor de la trombospondina 1, ligandos de Tie-2 (Regeneron, EE. UU.), inhibidores de la vía del factor tisular (EntreMed, EE. UU.), inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa, tumstatina, TZ 93, inhibidores del activador del plasminógeno urocinasa, vadimezán, vandetanib, vasostatina, vatalanib, antagonistas de VE-cadherina-2, xantorrizol, XL 784 (Exelixis, EE. UU.), ziv-aflibercept y ZD 6126.

[0101] En realizaciones, el uno o más agentes antineoplásicos adicionales son un agente activo adicional que interrumpe o inhibe las vías de señalización RAS-RAF-ERK o PI3K-AKT-TOR o es un antagonista de PD-1 y/o PD-L1. En realizaciones, el uno o más agentes anticancerígenos adicionales son un inhibidor de RAF, un inhibidor de EGFR, un inhibidor de MEK, un inhibidor de ERK, un inhibidor de PI3K, un inhibidor de AKT, un inhibidor de TOR, un inhibidor de MCL-1, un inhibidor de BCL-2, un inhibidor de SHP2, un inhibidor del proteasoma o inmunoterapia, incluyendo anticuerpos monoclonales, imidas inmunomoduladoras (IMiD), agentes anti-PD-1, anti-PDL-1, anti-CTLA4, anti-LAG1, anti-LAG3 y anti-OX40, agonistas de GITR, linfocitos T CAR y BiTE.

[0102] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de RAF incluyen dabrafenib, encorafenib, regorafenib, sorafenib y vemurafenib.

[0103] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de MEK incluyen binimetinib, CI-1040, cobimetinib, PD318088, PD325901, PD334581, PD98059, refametinib, selumetinib y trametinib.

[0104] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de ERK incluyen LY3214996, LTT462, MK-8353, SCH772984, ravoxertinib, ulixertinib y un ERKi como se describe en el documento WO 2017/068412.

[0105] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de PI3K incluyen análogos de 17-hidroxiwortmanina (por ejemplo, el documento WO 06/044453); AEZS-136; alpelisib; AS-252424; buparlisib; CAL263; copanlisib; CUDC-907; dactolisib (documento WO 06/122806); demetoxiviridina; duvelisib; GNE-477; GSK1059615; IC87114; idelalisib; INK1117; LY294002; Palomid 529; paxalisib; perifosina; PI-103; clorhidrato de PI-103; pictilisib (por ejemplo, documento WO 09/036082; documento WO 09/055730); PIK 90; PWT33597; SF1126; sonolisib; TGI 00-115; TGX-221; XL147; XL-765; wortmanina; y ZSTK474.

[0106] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de AKT incluyen Akt-1-1 (inhibe Aktl) (Barnett *et al.* (2005) *Biochem. J.*, 385 (Pt. 2), 399-408); Akt-1-1,2 (Barnett *et al.* (2005) *Biochem. J.* 385 (Pt. 2), 399-408); API-59CJ-Ome (por ejemplo, Jin *et al.* (2004) *Br. J. Cancer* 91, 1808-12); compuestos de 1H-imidazo[4,5-c]piridinilo (por ejemplo, documento WO05011700); indol-3-carbinol y derivados del mismo (por ejemplo, Patente de los EE. UU. N.º 6.656.963; Sarkar y Li (2004) *J Nutr.* 134(12 Supl), 3493S-3498S); perifosina, Dasmahapatra *et al.* (2004) *Clin. Cancer Res.* 10(15), 5242-52, 2004); análogos de lípidos de éter de fosfatidilinositol (por ejemplo, Gills y Dennis (2004) *Expert. Opin. Investig. Drugs* 13, 787-97); tricitabina (Yang *et al.* (2004) *Cancer Res.* 64, 4394-9); compuestos de imidazooxazona incluyendo clorhidrato de trans-3-amino-1-metil-3-[4-(3-fenil-5H-imidazo[1,2-c]pirido[3,4-e][1,3]oxazin-2-il)fenil]-ciclobutanol (documento WO 2012/137870); afuresertib; capivasertib; MK2206; patasertib y aquellos divulgados en los documentos WO 2011/082270 y WO 2012/177844.

[0107] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de TOR incluyen deforolimus; inhibidores de TORC1/TORC2 competitivos con ATP, incluyendo PI-103, PP242, PP30 y Torins 1; inhibidores de TOR en el potenciador de FKBP12, rapamicinas y derivados de las mismas, incluyendo temsirolimus, everolimus, WO 9409010; rapálogos, por ejemplo, como se divulgan en los documentos WO 98/02441 y WO 01/14387, por ejemplo, AP23573, AP23464 o AP23841; 40-(2-hidroxietil)rapamicina, 40-[3-hidroxi(hidroximetil)metilpropanoato]-rapamicina; 40-epi-(tetrazolil)-rapamicina (también denominada ABT578); 32-desoxorapamicina; 16-pentiniloxi-32(S)-dihidrorapamicina y otros derivados divulgados en el documento WO 05/005434; derivados divulgados en los documentos US 5.258.389, WO 94/090101, WO 92/05179, US 5118677, US 5118678, US 5100883, US 5151413, US 5120842, WO 93/111130, WO 94/02136, WO 94/02485, WO 95/14023, WO 94/02136, WO 95/16691, WO 96/41807, WO 96/41807 y US 5,256,790; y derivados de rapamicina que contienen fósforo (por ejemplo, documento WO 05/016252).

[0108] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de MCL-1 incluyen AMG-176, MIK665 y S63845.

[0109] Los ejemplos no limitantes de inhibidores de SHP2 incluyen inhibidores de SHP2 descritos en los documentos WO 2019/167000 y WO 2020/022323.

[0110] Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes antineoplásicos que son adecuados para su uso incluyen 2-etilhidrazida, 2,2',2''-triclorotrietilamina, ABVD, aceglatona, acemanano, glicósido de aldofosfamida, alfaradina, amifostina, ácido aminolevulínico, anagrelida, ANCER, ancestim, inmunotoxinas anti-CD22, hierbas

antitumorales, apazicuona, arglabina, trióxido de arsénico, azatioprina, BAM 002 (Novelos), bcl-2 (Genta), bestrabucilo, biricodar, bisantreno, bromocriptina, brostalicina, briostatina, butionina sulfoximina, caliculina, agentes antineoplásicos no específicos del ciclo celular, celmoleucina, clodronato, clotrimazol, ocfosfato de citarabina, DA 3030 (Dong-A), defofamina, denileucina difitox, dexrazoxana, diazicuona, ácido dicloroacético, dilazep, discodermolida, docosanol, doxercalciferol, edelfosina, eflornitina, EL532 (Elan), elfomitina, elsamitrucina, eniluracilo, etanidazol, exisulind, ferruginol, reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico, gacitosina, nitrato de galio, combinación de gimeracilo/oteracilo/tegafur (S-1), glicopina, diclorhidrato de histamina, diclofenaco HIT, genoterapia con HLA-B7 (Vical), fetoproteína alfa fetal humana, ibandronato, ácido ibandrónico, pauta de quimioterapia ICE, imexón, iobenguano, IT-101 (CRLX101), laniquidar, LC 9018 (Yakult), leflunomida, lentinano, levamisol + fluorouracilo, lovastatina, lucantona, masoprocol, melarsoprol, metoclopramida, miltefosina, miproxifeno, mitoguazona, mitozolomida, mopidamol, motexafina gadolinio, MX6 (Galderma), naloxona + pentazocina, nitracrina, nolatrexed, NSC 631570 octreótido (Ucrania), olaparib, proteína P-30, PAC-1, palifermina, pamidronato, ácido pamidrónico, pentosano polisulfato de sodio, fenamet, picibanilo, pixantrona, platino, ácido podofilínico, porfimer de sodio, PSK (Polisacárido-K), anticuerpo policlonal antitimocitos de conejo, realización de rasburi, ácido retinoico, etidronato de renio Re 186, romurtida, samario (153 Sm) leixidronam, sizofirano, fenilacetato de sodio, ácido esparfósico, espirogermanio, cloruro de estroncio-89, suramin, swainsonina, talaporfina, tariquidar, tazaroteno, tegafur-uracilo, temoporfina, ácido tenuazónico, tetraclorodecaóxido, trombopoyetina, etil etiopurpurina de estaño, tirapazamina, TLC ELL-12, tositumomab-yodo 131, combinación de trifluridina y tipiracilo, troponina I (Universidad de Harvard, EE. UU.), uretano, valspodar, verteporfina, ácido zoledrónico y zosuquidar.

[0111] La presente divulgación proporciona además un método para usar los compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) o composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, en combinación con radioterapia para tratar el cáncer. Se conocen técnicas para la administración de radioterapia en la técnica y estas técnicas pueden usarse en la terapia de combinación que se describe en el presente documento. La administración del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) en esta terapia de combinación puede determinarse como se describe en el presente documento. Puede administrarse radioterapia a través de uno de varios métodos, o una combinación de métodos, incluyendo, sin limitación, terapia de haz externo, radioterapia interna, radiación de implante, radiocirugía estereotáctica, radioterapia

sistémica, radioterapia y braquiterapia intersticial permanente o temporal. El término "braquiterapia", como se usa en el presente documento, se refiere a radioterapia administrada por un material radiactivo espacialmente confinado insertado en el cuerpo en o cerca de un tumor u otro sitio de enfermedad tisular proliferativa. El término pretende incluir, sin limitación, la exposición a isótopos radiactivos (por ejemplo, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32 e isótopos radiactivos de Lu). Las fuentes de radiación adecuadas para su uso como acondicionador celular de la presente divulgación incluyen tanto sólidos como líquidos. A modo de ejemplo no limitante, la fuente de radiación puede ser un radionúclido, tal como I-125, I-131, Yb-169, Ir-192 como fuente sólida, I-125 como fuente sólida u otros radionúclidos que emiten fotones, partículas beta, radiación gamma u otros rayos terapéuticos. El material radiactivo también puede ser un fluido hecho de cualquier solución de uno o más radionúclidos, por ejemplo, puede producirse una solución de I-125 o I-131, o un fluido radiactivo usando una suspensión de un fluido adecuado que contiene pequeñas partículas de radionúclidos sólidos, tales como Au-198, Y-90. Por otra parte, el uno o más radionúclidos pueden incorporarse en un gel o microesferas radiactivas.

[0112] La presente divulgación también proporciona métodos para terapias de combinación en las que se sabe que el agente activo adicional modula otras vías, u otros componentes de la misma vía, o incluso conjuntos superpuestos de enzimas diana que se usan en combinación con un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, dicha terapia incluye, pero sin limitación, la combinación de uno o más compuestos de las Fórmulas (I)-(VII) con agentes quimioterápicos, agentes inmunoterápicos, agentes de terapia hormonal, anticuerpos terapéuticos, agentes de terapia dirigida y tratamiento de radiación, para proporcionar un efecto terapéutico sinérgico o aditivo.

[0113] Los compuestos de la divulgación pueden usarse en combinación con los agentes divulgados en el presente documento u otros agentes adecuados, dependiendo de la afección que se esté tratando. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el uno o más compuestos de la divulgación se coadministrarán con otros agentes como se ha descrito anteriormente. Cuando se usan en terapia de combinación, los compuestos descritos en el presente documento se administran con el segundo agente simultáneamente o por separado. Esta administración en combinación puede incluir la administración simultánea de los dos agentes en la misma forma farmacéutica, la administración simultánea en formas farmacéuticas separadas y la administración separada. Es decir, un compuesto de las

Fórmulas (I)-(VII) y cualquiera de los agentes descritos anteriormente pueden formularse juntos en la misma forma farmacéutica y pueden administrarse simultáneamente. Como alternativa, un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y cualquiera de los agentes descritos anteriormente pueden administrarse simultáneamente, en donde ambos agentes están presentes en formulaciones separadas. En otra alternativa, un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) puede administrarse justo seguido de cualquiera de los agentes descritos anteriormente, o vice versa. En algunas realizaciones del protocolo de administración separado, un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y cualquiera de los agentes descritos anteriormente se administran con unos minutos de diferencia, o unas pocas horas de diferencia o unos pocos días de diferencia.

[0114] Como un aspecto de la presente divulgación se contempla el tratamiento de la enfermedad/afecciones con una combinación de compuestos farmacéuticamente activos que pueden administrarse por separado, la divulgación se refiere además a la combinación de composiciones farmacéuticas separadas en forma de kit. El kit comprende dos composiciones farmacéuticas independientes: un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII) y un segundo compuesto farmacéutico. El kit comprende un recipiente para contener las composiciones separadas tal como un frasco dividido o un envase de aluminio dividido. Los ejemplos adicionales de recipientes incluyen jeringas, cajas y bolsas. En algunas realizaciones, el kit comprende instrucciones para el uso de los componentes separados. La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en formas farmacéuticas diferentes (por ejemplo, orales y parenterales), se administran en intervalos de dosificación diferentes, o cuando el profesional sanitario que prescribe desea la valoración de los componentes individuales de la combinación.

[0115] La presente divulgación también proporciona el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia, o el uso del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en terapia. La presente divulgación también proporciona el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, o el uso de un compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el cáncer. La presente divulgación también proporciona el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, o el uso del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente divulgación también

proporciona el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente antineoplásico adicional, para su uso en el tratamiento del cáncer, o el uso del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el agente antineoplásico adicional para tratar el cáncer. La divulgación también proporciona el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente antineoplásico adicional, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, o el uso del compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el agente antineoplásico adicional, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer, o el uso de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el cáncer. La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un agente antineoplásico adicional, para su uso en el tratamiento del cáncer, o el uso de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de las Fórmulas (I)-(VII), o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el agente antineoplásico adicional, para tratar el cáncer.

Métodos de preparación de los compuestos de la divulgación

[0116] Los compuestos que se describen en el presente documento pueden prepararse de acuerdo con los procedimientos de los siguientes esquemas y ejemplos, usando materiales adecuados, y se ejemplifican adicionalmente mediante los siguientes ejemplos específicos. Sin embargo, no debe considerarse que los compuestos ilustrados en los ejemplos forman el único género que se considera la divulgación. Los ejemplos ilustran además detalles para la preparación de los compuestos de la presente divulgación. Los expertos en la materia comprenderán rápidamente que pueden usarse variaciones conocidas de las condiciones y procesos de los siguientes procedimientos preparativos para preparar estos compuestos. Por ejemplo, en algunos casos, el orden de realización de las etapas de los esquemas de reacción puede variarse para facilitar la reacción o para evitar productos de reacción no deseados. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no pretenden ser limitaciones de la divulgación. Cualquier intermedio descrito a continuación puede denominarse en el presente documento por su número precedido por "Int ".

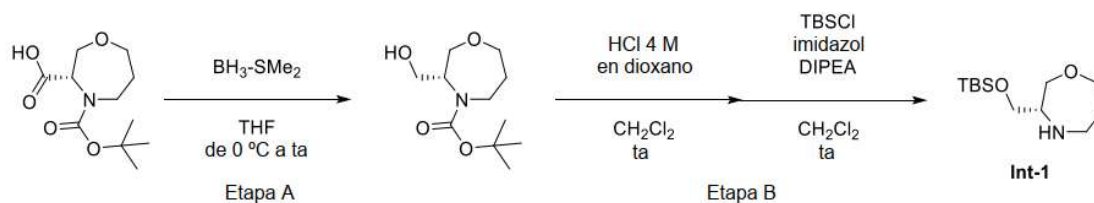
[0117] A lo largo de los esquemas de síntesis y de los ejemplos, pueden usarse abreviaturas y acrónimos con los siguientes significados, a menos que se indique otra cosa: ac. = acuoso; atm = atmósfera; Bodipy-GDP = mezcla de hidrógeno difosfato de ((2R,3S,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-3-(((2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimetil-5H-4l4,5l4-dipirrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-il)propanamido)etil)carbamoil)oxi)-4-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metilo e hidrógeno difosfato de ((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-oxo-1,6-dihidro-9H-purin-9-il)-4-(((2-(3-(5,5-difluoro-7,9-dimetil-5H-4l4,5l4-dipirrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-3-il)propanamido)etil)carbamoil)oxi)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-il)metilo (InvitrogenTM, número de catálogo G22360); cataCXium A Pd G2 = cloro[(di(1-adamantil)-*N*-butilfosfina)-2-(2-aminobifenil)]paladio(II); cataCXio A Pd G3 = mesilato de [(di(1-adamantil)-*n*-butilfosfina)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II); conc. = concentración; D = deuterio; DAST = trifluoruro de (dietilamino)azufre; dba = dibencilidenoacetona; DCM = diclorometano; DHP = 3,4-dihidro-2*H*-pirano; DIBAL-H = hidruro de diisobutilaluminio; DIPEA = DIEA = *N,N*-diisopropiletilamina; DMF = *N,N*-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; dppf = 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno; EDTA = ácido etilendiaminotetraacético; equiv, eq. = equivalente(s); IEN = electronebulización; Et = etilo; EtOAc = acetato de etilo; EtOH = etanol; GDP = difosfato de guanosina; GTP = trifosfato de guanosina; h = hora; HEPES = ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico; HMPA = hexametilfosforamida; HPLC = cromatografía de líquidos de alta presión; Int = intermedio; *i*Pr = isopropilo; IPA = *i*-PrOH = alcohol isopropílico; KHMDS = bis(trimetilsilil)amida de potasio; CLEM = cromatografía de líquidos-espectrometría de masas; min = minuto; LDA = diisopropilamida de litio; LiHMDS = Bis(trimetilsilil)amida de litio; M = Molar; *m*-CPBA = ácido 3-clorobenzoperoxoico = *m*-ácido cloroperoxibenzoico; Me = metilo; MeCN, ACN = acetonitrilo; MeOH = metanol; MS = espectrometría de masas; NBS = *N*-bromosuccinimida; ND = no determinado; RMN = resonancia magnética nuclear; PG = propilenglicol; Éter de pet. = éter de petróleo; POCl₃ = cloruro de óxido de fósforo(V); RP-HPLC = HPLC de fase inversa; t.a. = temperatura ambiente; sat. = saturado; SEM = (2-metoxietil)trimetilsilano; SEMCl = (2-clorometoxietil)trimetilsilano; SFC = cromatografía de fluidos supercríticos; SOS = Hijo de Sevenless; SPhos Pd G3 = metanesulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II); TBAF = fluoruro de tetra-*n*-butilamonio; TBS = *tert*-butildimetilsililo; TBSCl = *tert*-butildimetilclorosilano; TEA = Et₃N = trietilamina; Tf = trifluorometilsulfonilo; Tf₂O = anhídrido trifluorometanosulfónico; TFA = ácido trifluoroacético; THF = tetrahidrofurano;

THP = tetrahidropirano; TIPS = triisopropilsililo; TIPSCCBr = (bromoetnil)triisopropilsilano; TLC = cromatografía en capa fina TR-FRET = transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo; TsOH = ácido *p*-toluenosulfónico = ácido 4-metilbencenosulfónico; Tween = monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano; VCD = dicroísmo circular vibracional; v, v/v = volumen, volumen en volumen; p, p/p = peso, peso en peso, μm = micrómetro.

EJEMPLOS

[0118] La concentración se refiere a la retirada de los componentes volátiles a presión reducida (por ejemplo, por evaporación rotatoria) a menos que se indique otra cosa. Todas las temperaturas están en grados Celsius a menos que se indique otra cosa. Los espectros de masas (EM) se midieron por ionización por electronebulización - espectroscopía de masas (IEN) en modo de detección de iones positivos y m/z se refiere al ion $[M+H]^+$, a menos que se indique otra cosa. Se registraron espectros de ^1H RMN a 400-600 MHz a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa. Los protones publicados como 0,5 H se deben a señales rotaméricas. RP-HPLC se refiere a HPLC de fase inversa en columnas preparativas o semipreparativas funcionalizadas con C18 con elución en gradiente usando acetonitrilo y agua modificados con ácido trifluoroacético o hidróxido de amonio como eluyentes y fracciones liofilizadas o concentradas por evaporación rotativa a menos que se indique otra cosa. La purificación por cromatografía en columna sobre gel de sílice se logró usando un sistema de cromatografía ultrarrápida (por ejemplo, ISCO® o Biotage®) y columnas de gel de sílice preempaquetadas comerciales con elución usando los sistemas disolventes indicados. Los compuestos descritos en el presente documento se sintetizaron en forma de los racematos, a menos que se indique otra cosa en los procedimientos experimentales y las tablas de compuestos. Determinados productos/intermedios en los ejemplos incluyen la indicación de "Pico 1" y/o "Pico 2", que se refieren al orden de elución del producto/intermedio indicado de la columna de cromatografía (por ejemplo, una columna de SFC) utilizada para aislar el compuesto en las condiciones especificadas. Por lo tanto, por ejemplo, Pico 1 se refiere al primer compuesto en eluir, por ejemplo, el primer estereoisómero en eluir, en las condiciones especificadas.

[0119] Las columnas de SFC y HPLC utilizadas en la resolución de estereoisómeros se resumen en la siguiente tabla:

Síntesis de intermedios:**[0120] Intermedio 1: (S)-3-(((*tert*-butildimetilsililo)oxi)metil)-1,4-oxazepano (**Int 1**)****[0121] Etapa A: (R)-3-(Hidroximetil)-1,4-oxazepano-4-carboxilato de etilo de *tert*-butilo**

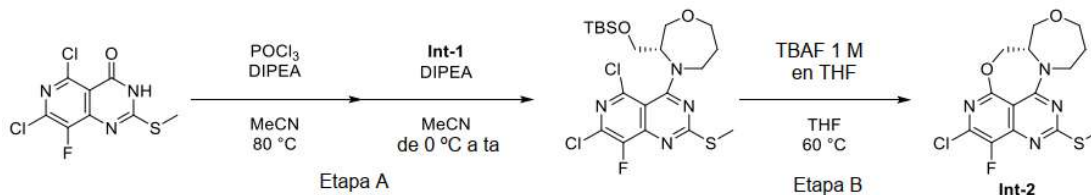
[0122] A una solución de ácido (*S*)-4-(*tert*-butoxicarbonil)-1,4-oxazepano-3-carboxílico (980 mg, 4,00 mmol) en THF (9,8 ml) se le añadió complejo de sulfuro de dimetilo de borano (0,799 ml, 7,99 mmol, 10 M) a 0 °C. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 19 h, la reacción se inactivó mediante la adición de H₂O. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10-100 %, gradiente de EtOAc en hexano) para producir (*R*)-3-(hidroximetil)-1,4-oxazepano-4-carboxilato de *tert*-butilo. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 232.

[0123] Etapa B: (S)-3-(((*tert*-butildimetilsililo)oxi)metil)-1,4-oxazepano (Int 1**)**

[0124] A una solución de (*R*)-3-(hidroximetil)-1,4-oxazepano-4-carboxilato de *tert*-butilo (767 mg, 3,32 mmol) en CH₂Cl₂ (7,7 ml) se le añadió HCl (4,97 ml, 19,9 mmol, 4,0 M en dioxano). Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h, la mezcla de reacción se concentró al vacío. La mezcla en bruto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

[0125] A la mezcla en bruto de clorhidrato de amina en CH₂Cl₂ (7,7 ml) se le añadieron DIPEA (2,84 ml, 16,6 mmol), imidazol (226 mg, 3,32 mmol) y *tert*-butildimetilclorosilano (650 mg, 4,31 mmol) a 0 °C. Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 h, la reacción se inactivó mediante la adición de H₂O. La mezcla de reacción se extrajo con CHCl₃, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío para producir (*S*)-3-(((*tert*-butildimetilsililo)oxi)metil)-1,4-oxazepano (**Int 1**). Este compuesto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 3,89-3,84 (m, 1H), 3,84 - 3,81 (m, 1H), 3,80 - 3,70 (m, 1H), 3,53 (dd, *J* = 9,6, 5,2 Hz, 1H), 3,45 (dd, *J* = 9,6, 7,2 Hz, 1H), 3,36 (dd, *J* = 12,4, 8,9 Hz, 1H), 3,15 (dt, *J* = 13,5, 4,9 Hz, 1H), 3,10 - 3,00 (m, 1H), 2,99 - 2,92 (m, 1H), 2,90 - 2,81 (m, 1H), 2,54 - 2,41 (m, 1H), 1,90 - 1,84 (m, 1H), 0,89 (s, 9H), 0,05 (s, 6H).

[0126] Intermedio 2s: (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (Int 2)



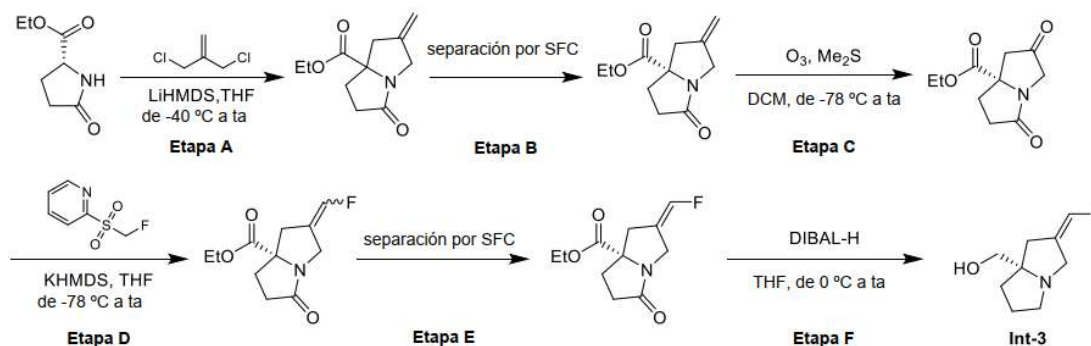
[0127] Etapa A: (S)-3-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(5,7-dicloro-8-fluoro-2-(metiltio)pirido[4,3-*d*]pirimidin-4-il)-1,4-oxazepano

[0128] A una suspensión de 5,7-dicloro-8-fluoro-2-(metiltio)pirido[4,3-*d*]pirimidin-4(3*H*)-ona (900 mg, 3,21 mmol) en MeCN (16 ml) se le añadieron POCl₃ (0,360 ml, 3,86 mmol) y DIPEA (1,10 ml, 6,43 mmol). Después de agitar la mezcla a 80 °C durante 1 h, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. A la mezcla de reacción se le añadieron DIPEA (1,10 ml, 6,43 mmol) y (S)-3-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-1,4-oxazepano (**Int 1**) a 0 °C.

Después de agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, la reacción se inactivó mediante la adición de H₂O. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc, se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10-50 %, gradiente de EtOAc en hexano) para producir (S)-3-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(5,7-dicloro-8-fluoro-2-(metiltio)pirido[4,3-*re*]pirimidin-4-il)-1,4-oxazepano. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 507.

[0129] Etapa B: (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (Int 2)

[0130] A una solución de (S)-3-(((*tert*-butildimetilsilil)oxi)metil)-4-(5,7-dicloro-8-fluoro-2-(metiltio)pirido[4,3-*d*]pirimidin-4-il)-1,4-oxazepano (1,53 g, 3,02 mmol) en THF (15 ml) se le añadió TBAF (9,05 ml, 9,05 mmol, 1,0 M en THF). Después de agitar la mezcla a 60 °C durante 12 h, la reacción se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc, se lavó con tampón de fosfato, salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se suspendió con CHCl₃/isopropil éter, se filtró y se lavó con isopropil éter. El filtrado se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10-80 %, gradiente de EtOAc en hexano) para producir (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (**Int 2**). EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 357. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5,03-4,94 (m, 1H), 4,70-4,63 (dd, *J* = 13,5, 4,5 Hz, 1H), 4,49 (d, *J* = 13,5 Hz, 1H), 4,32 - 4,25 (m, 1H), 4,07 (dd, *J* = 12,3, 3,8 Hz, 1H), 3,89 - 3,81 (m, 1H), 3,61 - 3,52 (m, 1H), 3,44 - 3,33 (m, 2H), 2,53 (s, 3H), 2,02-1,80 (m, 2H).

[0131] Intermedio 3: (S,Z)-(2-(Fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metanol**(Int 3)****[0132] Etapa A: 2-Metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo de etilo**

[0133] A una mezcla de (R)-5-oxopirrolidina-2-carboxilato de etilo (50 g, 318 mmol) y 3-cloro-2-(clorometil)prop-1-eno (63,6 g, 509 mmol) en THF (300 ml) se añadió LiHMDS gota a gota (636 ml, 636 mmol, 1 M en THF) a -40 °C en atmósfera de nitrógeno. Después, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 20 h. La TLC (éter de petróleo/acetato de etilo = 1/1) mostró que el material de partida se había consumido y se formaron tres nuevas manchas principales. La mezcla de reacción se inactivó con una solución saturada de NH_4Cl (200 ml) y se extrajo con EtOAc (200 ml x 3). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un producto en bruto, que se purificó por cromatografía en columna (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 120 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-50 % en éter de petróleo a 80 ml/min) para proporcionar 2-metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo racémico en forma de aceite incoloro. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 210.

[0134] Etapa B: (S)-2-Metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo

[0135] El 2-metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo racémico (50 g, 239 mmol) se separó por SFC preparativa (Instrument SFC-17 Columna DAICEL CHIRALPAK AS (250 mm x 50 mm, 10 μm) Condición Neu-EtOH, Inicio de B 25, Fin de B 25, Tiempo de gradiente (min) 200, 100 % de B Tiempo de retención (min) 10 Caudal (ml/min) 200 Inyecciones 200) para proporcionar (R)-2-metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo (el primer isómero en eluir de SFC) y (S)-2-metilen-5-oxotetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo (el segundo isómero en eluir de SFC). EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 210. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5,07-4,88 (m, 2H), 4,22

(d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 4,13 (c, $J = 7,2$ Hz, 2H), 3,70 - 3,58 (m, 1H), 2,98 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H), 2,78 - 2,65 (m, 1H), 2,54 (ddd, $J = 13,1, 9,1, 1,6$, 1H), 2,46 - 2,33 (m, 2H), 2,12 - 2,00 (m, 1H), 1,20 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H).

[0136] Etapa C: (S)-2,5-Dioxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo

[0137] A una solución de (S)-2-metileno-5-oxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo (790 mg, 3,78 mmol) en DCM (15 ml) se le burbujeó O_3 a -78 °C hasta que la mezcla se volvió azul. Después de la finalización de la reacción, se añadió sulfuro de dimetilo (469 mg, 7,55 mmol) a la mezcla y la mezcla se agitó a 20 °C durante 16 h. LCMS mostró que el material de partida se había consumido y se encontró la MS deseada. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 ml) y se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar el producto en bruto, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 4 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-50 % en éter de petróleo a 40 ml/min) para proporcionar (S)-2,5-dioxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 212.

[0138] Etapa D: (S)-2-(Fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo

[0139] A una solución de 2-((fluorometil)sulfonyl)piridina (804 mg, 4,59 mmol) en THF (10,0 ml) se le añadió KHMDS (5,42 ml, 5,42 mmol, 1 M en THF) a -78 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de 30 min, se añadió (S)-2,5-dioxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo (881 mg, 4,17 mmol) en THF (3 ml) lentamente a -78 °C y la mezcla se agitó durante 3 h. Después, el sistema de reacción se calentó a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se interrumpió con solución acuosa saturada de cloruro de amonio (1 ml), seguida de HCl (2 ml, 3 M en agua). La mezcla se extrajo con EtOAc (20 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente: acetato de etilo al 0-30 %/éter de petróleo) para proporcionar (S)-2-(fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 228.

[0140] Etapa E: (S,Z)-2-(Fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo

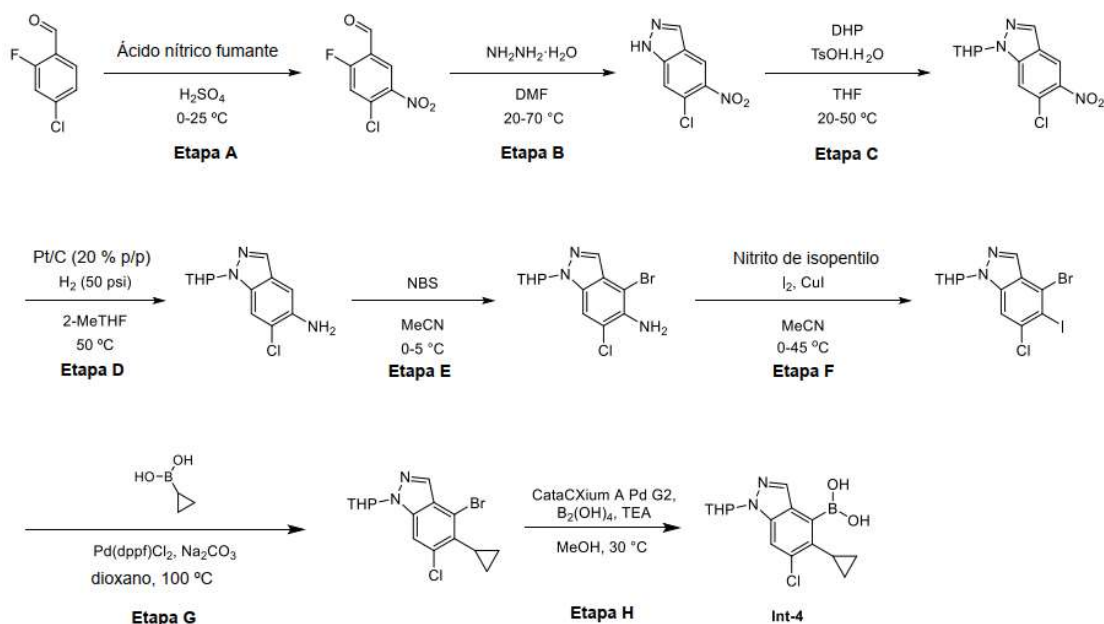
[0141] Se separó (S)-2-(fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1H-pirrolizina-7a(5H)-carboxilato de etilo (210 mg, 0,924 mmol) por SFC preparativa (Columna DAICEL CHIRALPAK AY-H (250 mm x 30 mm, 5 μ m) Condición NH_3H_2O al 0,1 % EtOH Inicio de B 10 Fin de B 10

Tiempo de gradiente (min) 60 100 % de B Tiempo de retención 60 Caudal (ml/min) 90 Inyecciones 60) para proporcionar (*S,Z*)-2-(fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (el primer isómero en eluir de SFC) y (*S,E*)-2-(fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (el segundo isómero en eluir de SFC). EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 228.

[0142] Etapa F: (*S,Z*)-(2-(Fluorometilen)tetrahydro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metanol (**Int 3**)

[0143] A una solución de (*S,Z*)-2-(fluorometilen)-5-oxotetrahydro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (84,6 g, 372 mmol) en THF (508 ml) se le añadió DIBAL-H gota a gota (1,12 l, 1 M en tolueno) a 0 °C. La solución resultante se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se inactivó con Na₂SO₄·10H₂O. El sólido se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. Se añadió HCl (400 ml, 4 M en acetato de etilo) y después la mezcla resultante se agitó durante 30 min a ta. Después, la mezcla se concentró a presión reducida para proporcionar (*S,Z*)-(2-(fluorometilen)tetrahydro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metanol (**Int 3**, sal de HCl) que se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 172.

[0144] Intermedio 4: ácido (6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)borónico (**Int 4**)



[0145] Etapa A: 4-cloro-2-fluoro-5-nitrobenzaldeído

[0146] Se disolvió 4-cloro-2-fluorobenzaldeído (1,00 kg, 6,31 mol, 1,00 eq) en H₂SO₄ (5,00 l) y se indica como sistema R1. Se disolvió ácido nítrico fumante (517 g, 8,20 mol,

1,30 eq) en H_2SO_4 (2,00 l) y se indica como sistema R2. Los sistemas R1 y R2 se hicieron pasar a través de un instrumento de química de fluidos y reaccionaron durante 3 h a 0-25 °C. La reacción se controló con TLC. La mezcla se vertió en hielo-agua (36,0 l) y el sólido se separó. Después, la mezcla se filtró y la torta se lavó con agua (5,00 l x 2). El producto se secó al aire para producir 4-cloro-2-fluoro-5-nitrobenzaldehído. El producto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ 10,31 (s, 1H), 8,46 (d, J = 6,8 Hz, 1H), 7,48 (d, J = 9,2 Hz, 1H).

[0147] Etapa B: 6-cloro-5-nitro-1*H*-indazol

[0148] A una solución de 4-cloro-2-fluoro-5-nitrobenzaldehído (1,80 kg, 982 mmol, 1,00 eq) en DMF (12,6 l) se le añadió $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1.94 kg, 30,9 mol, 1,88 l, pureza del 80 %, 3,50 eq) gota a gota a 20-30 °C. La mezcla de reacción se agitó a 60-70 °C durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se enfrió a 20-30 °C y se añadió agua (21,6 l). El sólido precipitó y la mezcla resultante se filtró, y la torta se lavó con agua (9,00 l). El producto se secó al aire para producir 6-cloro-5-nitro-1*H*-indazol. El producto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ^1H RMN (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13,76 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,92 (s, 1H).

[0149] Etapa C: 6-cloro-5-nitro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol

[0150] A una solución de 6-cloro-5-nitro-1*H*-indazol (1,50 kg, 7,59 mol, 1,00 eq) en THF (10,5 l) a 20-30 °C se le añadieron $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (144 g, 759 mmol, 0,10 eq) y DHP (1,28 kg, 15,1 mol, 1,39 l, 2,00 eq) a 20-30 °C. La mezcla de reacción se agitó a 40-50 °C durante 5 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío a 40-50 °C y después se diluyó con EtOAc (7,50 l) y agua (10,5 l). La capa orgánica se lavó con NaHCO_3 ac. (7,50 l) y salmuera (7,50 l), y se secó sobre Na_2SO_4 . La solución orgánica se concentró a 1/3 a 40-45 °C a presión reducida, y se añadió *n*-heptano (7,50 l) y se concentró a 1/3 3 veces. Después, la mezcla se filtró y la torta resultante se lavó con *n*-heptano (6,00 l) para producir 6-cloro-5-nitro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol. ^1H RMN (400MHz, CDCl_3) δ 8,38(s, 1H), 8,15 (s, 1H), 7,81 (s, 1H), 5,72 (dd, J = 9,2, 8,8 Hz, 1H), 4,03 - 3,99 (m, 1H), 3,81 - 3,77 (m, 1H), 2,49 - 2,45 (m, 1H), 2,16 - 2,12 (m, 2H), 1,78-1,71 (m, 3H).

[0151] Etapa D: 6-cloro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-5-amina

[0152] A una solución de 6-cloro-5-nitro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol (500 g, 479 mmol, 1,00 eq) en 2-MeTHF (3,50 l) se le añadió Pt/C (100 g, 23,7 mmol) al reactor en atmósfera de Ar a 20 °C. La mezcla resultante se desgasificó al vacío y después se purgó con H_2 tres veces. La mezcla de reacción se agitó a 50 °C en atmósfera de H_2 (0,3447 MPa (50 psi)) durante 12 h. La mezcla se filtró y la torta se lavó con 2-MeTHF (2,50 l x 2). El

filtrado se concentró al vacío a 40-50 °C para producir 6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-amina. El producto se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,81 (s, 1H), 7,59 (s, 1H), 7,02 (s, 1H), 5,61-5,58 (dd, *J* = 9,2, 9,2 Hz, 1H), 4,03 - 4,00 (m, 3H), 3,76 - 3,71 (m, 1H), 2,52 - 2,49 (m, 1H), 2,14 - 2,05 (m, 2H), 1,77-1,65 (m, 3H).

[0153] Etapa E: 4-bromo-6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-amina

[0154] A una solución de 6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-amina (450 g, 1,79 mol, 1,00 eq) en MeCN (3,15 l) se le añadió NBS (381 g, 2,15 mol, 1,20 eq) en cuatro lotes en atmósfera de N₂ a 0-5 °C. La mezcla resultante se agitó a 0-5 °C durante 3 h. Después, la mezcla de reacción se vertió en solución ac. de NaHCO₃ (3,15 l) y después se extrajo con EtOAc (4,50 l). Después, la capa orgánica se lavó con salmuera (4,50 l) y después se secó sobre Na₂SO₄. La solución orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, éter de petróleo/acetato de etilo = de 100/1 a 1/1) para producir 4-bromo-6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-amina. ¹H RMN (400MHz, CDCl₃) δ 7,83 (s, 1H), 7,58 (s, 1H), 5,60 (dd, *J* = 9,2, 8,4 Hz, 1H), 4,35 (s, 2H), 3,98 - 3,97 (m, 1H), 3,80 - 3,69 (m, 1H), 2,52 - 2,45 (m, 1H), 2,15 - 2,05 (m, 2H), 1,80-1,65 (m, 3H).

[0155] Etapa F: 4-bromo-6-cloro-5-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol

[0156] A una solución de 4-bromo-6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-amina en MeCN (2,10 l) se le añadieron I₂ (268 g, 1,06 mol, 213 ml, 1,00 eq) y CuI (20,1 g, 105 mmol, 0,10 eq) a 0 °C. Después, se añadió nitrito de isopentilo (148 g, 1,27 mol, 171 ml, 1,20 eq) gota a gota a la mezcla a 0 °C. La mezcla resultante se calentó a 45 °C y se agitó durante 3 h. La reacción se interrumpió añadiendo Na₂SO₃ (2,50 l) a 25 °C. Después, la mezcla se extrajo con EtOAc (2,50 l x 2) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2,50 l), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 100/1 a 0/1) para producir 4-bromo-6-cloro-5-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,93 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 1,6 Hz, 1H), 5,66 - 5,63 (m, 1H), 3,98 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H), 3,77 - 3,72 (m, 1H), 2,49 - 2,45 (m, 1H), 2,13 - 2,10 (m, 2H), 1,76-1,68 (m, 3H).

[0157] Etapa G: 4-bromo-6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol

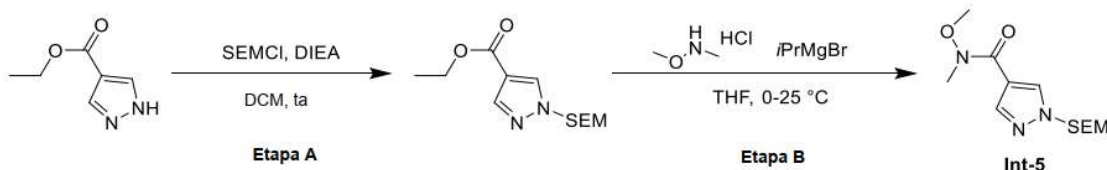
[0158] A una solución de 4-bromo-6-cloro-5-yodo-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (50,0 g, 90,6 mmol, 1,00 eq) en dioxano (350 ml) se le añadieron Na₂CO₃ (1 M, 453 ml, 5,00 eq.), ácido ciclopropilborónico (9,34 g, 108.mmol, 1,20 eq.) y Pd(dppf)Cl₂ (13,2 g,

18,1 mmol, 0,20 eq) en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 12 h. La reacción se inactivó añadiendo H₂O (350 ml) a 25 °C y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (350 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (350 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. La solución orgánica se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (SiO₂, Éter de petróleo/acetato de etilo = de 50/1 a 1/1) seguido de HPLC prep (columna: Welch Xtimate C18 250 x 100 mm N.º 10 µm; fase móvil: [H₂O (NH₄HCO₃ 10 mM)-ACN]; gradiente: 70 %-100 % durante 18,0 min) para producir 4-bromo-6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,98 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 5,64 - 5,61 (m, 1H), 4,01 - 3,97 (m, 1H), 3,75 - 3,71 (m, 1H), 2,50 - 2,47 (m, 1H), 2,13 - 2,08 (m, 2H), 1,84 - 1,67 (m, 4H), 1,22 - 1,19 (m, 2H), 0,80-0,77 (m, 2H).

[0159] Etapa H: ácido (6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)borónico (Int 4)

[0160] A una solución de 4-bromo-6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol (8 g, 22,49 mmol) en MeOH (60 ml) se le añadieron TEA (12,54 ml, 90 mmol), tetrahidrobisborato (3,02 g, 33,7 mmol) y mesilato de [(di(1-adamantil)-*N*-butilfosfina)-2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (1,504 g, 2,249 mmol) a 20 °C en atmósfera de N₂. La reacción se agitó a 30 °C durante 2 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice Agela® de 80 g, gradiente del 0-10 % de EtOAc/EtOH=3:1 en éter de petróleo a 40 ml/min, cargado en seco) para proporcionar ácido (6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)borónico (**Int 4**). EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 321.

[0161] Intermedio 5: *N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (Int 5)



[0162] Etapa A: 1-((2-(Trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo

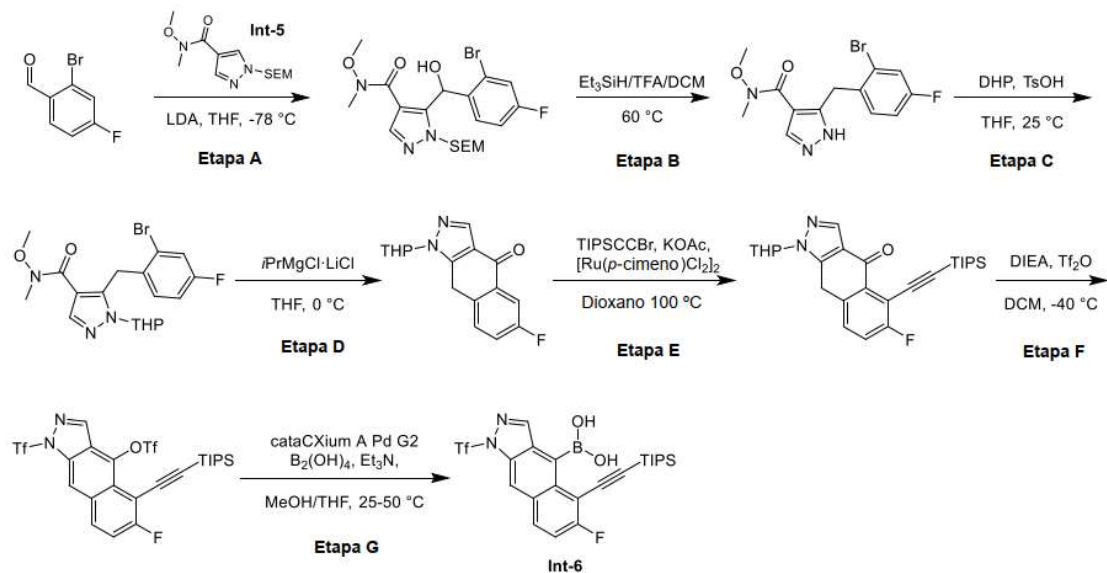
[0163] A una solución de 1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo (13,8 g, 98 mmol) en DCM (100 ml) se le añadió DIEA (25,4 g, 196 mmol) y la mezcla se agitó durante 15 min a 0 °C. Se añadió (2-clorometoxietil)trimetilsilano (24,5 g, 147 mmol) lentamente y la mezcla se

agitó a 25 °C durante 16 h. La reacción se interrumpió con agua (50 ml) y la mezcla resultante se extrajo con DCM (200 ml x 3). La capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 220 g, Eluyente de gradiente de EtOAc al 0-35 %/Éter de pet. a 80 ml/min) para proporcionar 1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 271.

[0164] Etapa B: *N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (Int 5)

[0165] A una solución de 1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo (20 g, 74,0 mmol) y clorhidrato de *N,O*-dimetilhidroxilamina (10,8 g, 111 mmol) en THF seco (350 ml) se le añadió *i*PrMgBr (77 ml, 222 mmol, 2,9 M en 2-metiltetrahydrofurano) a 0 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 16 h. La reacción se interrumpió con NH₄Cl (100 ml) acuoso y la mezcla resultante se extrajo con EtOAc (300 ml x 3). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se evaporó a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 220 g, Eluyente de gradiente de EtOAc al 0-50 %/Éter de pet. a 70 ml/min) para proporcionar *N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (**Int 5**). EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 286.

[0166] Intermedio 6: ácido (6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)borónico (Int 6)



Etapa A: 5-((2-bromo-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida

[0167] A una solución agitada de *N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (**Int 5**, 24,74 g, 87 mmol) en THF (50 ml) se le añadió diisopropilamida de litio (95 ml, 95 mmol, 1 M en THF) a -78 °C en atmósfera de N₂, y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 1 h en atmósfera de N₂. Se añadió 2-bromo-4-fluorobenzaldehído (16 g, 79 mmol) a -78 °C y la mezcla se agitó a -78 °C durante 1 h. La reacción se inactivó con agua (50 ml) y se extrajo con EtOAc (500 ml x 3). Las capas orgánicas se lavaron con salmuera saturada (50 ml) y se secaron sobre Na₂SO₄. La solución orgánica se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; Columna de sílice ultrarrápida-CS Agela® (330 g), Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-25 %/éter de petróleo a 30 ml/min) para proporcionar 5-((2-bromo-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 488, 490.

[0168] Etapa B: 5-(2-bromo-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida

[0169] A una solución de 5-((2-bromo-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (20 g, 40,9 mmol) en DCM (56 ml) se le añadieron trietilsilano (118 ml, 737 mmol) y TFA (56,8 ml, 737 mmol), y la mezcla se agitó a 60 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se diluyó con EtOAc (400 ml). La solución orgánica se lavó con NaHCO₃ acuoso y salmuera (30 ml x 2) y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄. La solución orgánica se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; Columna de sílice ultrarrápida-CS Agela® (220 g), Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-15 %/éter de petróleo a 50 ml/min) para proporcionar 5-(2-bromo-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 342, 344.

[0170] Etapa C: 5-(2-bromo-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida

[0171] A una solución de 5-(2-bromo-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida (7,5 g, 21,92 mmol) en THF (80 ml) se le añadieron ácido 4-metilbencenosulfónico (0,377 g, 2,19 mmol) y DHP (4,01 ml, 43,8 mmol) a 25 °C, y la mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ISCO®, columna ultrarrápida Agela de 80 g, éter de petróleo/EtOAc = 2/1) para proporcionar 5-(2-bromo-4-

fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida.

EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 426, 428.

[0172] Etapa D: 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona

[0173] A una solución agitada de 5-(2-bromo-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (7,5 g, 17,59 mmol) en THF (225 ml) se le añadió gota a gota cloruro de isopropilmagnesio · cloruro de litio (67,7 ml, 88 mmol, 1,3 M en THF) durante 5 min a -5 °C. Una vez finalizada la adición, la reacción se agitó a 0 °C durante 3 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se vertió en una solución acuosa saturada de NH₄Cl (50 ml) y la mezcla se extrajo con EtOAc (300 ml x 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®, columna ultrarrápida Agela de 120 g, éter de petróleo/EtOAc = 2/1) para proporcionar 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 287.

[0174] Etapa E: 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona

[0175] A una solución de 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona (3,5 g, 10,4 mmol) en dioxano (50 ml) se le añadieron (bromoetnil)triisopropilsilano (5,43 g, 20,8 mmol), acetato de potasio (2,35 g, 23,9 mmol) y dímero de dicloro(*p*-cimen)ruteno(II) (3,18 g, 5,20 mmol) a 25 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 100 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió, se diluyó con EtOAc (50 ml) y la mezcla resultante se lavó con salmuera (5 ml x 2). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 40 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 20 % en éter de petróleo a 25 ml/min) para proporcionar 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 467.

[0176] Etapa F: trifluorometanosulfonato de 6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo

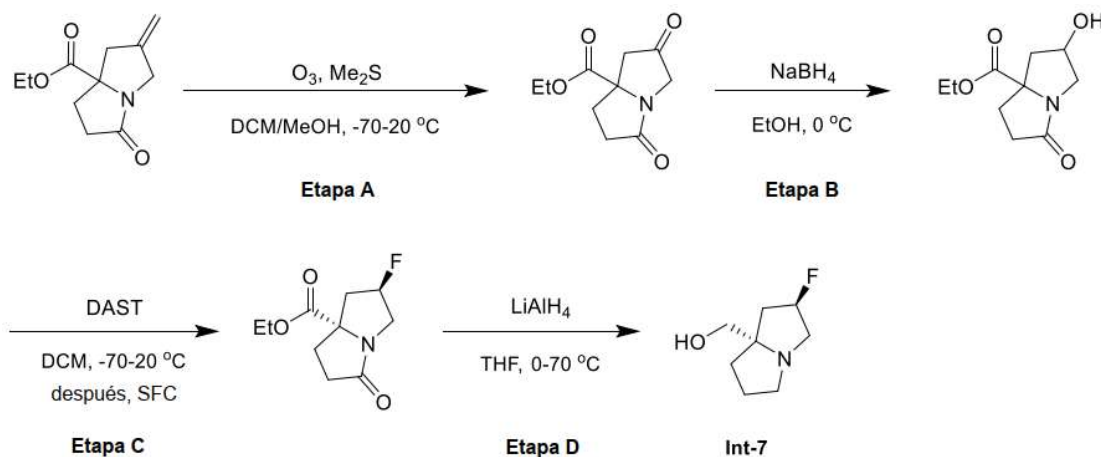
[0177] A una solución de 6-fluoro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona (2,7 g, 4,05 mmol) y DIEA (4,24 ml, 24,3 mmol) en DCM (20 ml) se le añadió Tf₂O (2,05 ml, 12,2 mmol) a -40 °C, y la mezcla de reacción se agitó a -40 °C durante 15 min. La mezcla de reacción se concentró al vacío a 30 °C y el

residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (ISCO[®], columna ultrarrápida Agela de 40 g, éter de petróleo/EtOAc = 20/1) para proporcionar trifluorometanosulfonato de 6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonil)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,63 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,96 (dd, *J* = 9,3, 5,4 Hz, 1H), 7,51 - 7,41 (m, 1H), 1,17-1,06 (m, 21H).

[0178] Etapa G: ácido (6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonil)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)borónico (Int 6)

[0179] A una solución de trifluorometanosulfonato de 6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonil)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo (220 mg, 0,340 mmol) en MeOH (2,5 ml) y THF (2,5 ml) se le añadieron tetrahidroxidiboro (213 mg, 2,38 mmol), cloro[(di(1-adamantil)-*N*-butilfosfina)-2-(2-aminobifenil)]paladio(II) (22,8 mg, 0,034 mmol) y trietilamina (103 mg, 1,02 mmol) a 25 °C, y la mezcla se agitó a 50 °C durante 2 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se purificó mediante una placa de TLC preparativa (SiO₂, éter de petróleo/EtOAc = 10/1) para proporcionar ácido (6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonil)-5-((triisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)borónico (**Int 6**). EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 543.

[0180] Intermedio 7: ((2*R*,7*aS*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metanol (**Int 7**)



[0181] Etapa A: 2,5-Dioxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7*a*(5*H*)-carboxilato de etilo

[0182] Se burbujeó ozono (239 mmol) (0,5~1 m³/h) en una solución de 2-metilen-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-carboxilato de etilo (Etapa A de **Int 3**) (160 g, 765 mmol en DCM (1,60 l) y MeOH (160 ml) a -70 °C durante 9 h. Se burbujeó nitrógeno a través de la mezcla de reacción para purgar el ozono en exceso. Después, se añadió sulfuro de dimetilo (76,0 g, 1,22 % en moles) a la mezcla a -70 °C. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 14 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para

proporcionar un residuo. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluente: Éter de petróleo: Acetato de etilo = 50:1 a 1:1) para proporcionar 2,5-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 212.

[0183] Etapla B: 2-Hidroxi-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo

[0184] A una solución de 2,5-dioxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (200 g, 947 mmol) en EtOH (2,00 l) a 0 °C en atmósfera de N₂ se le añadió NaBH₄ (10,8 g, 284 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de NH₄Cl sat. (50,0 ml) a 5 °C, y la mezcla se agitó a 5 °C durante 0,5 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (eluente: Éter de petróleo: Acetato de etilo = 50:1 a 1:1) para proporcionar 2-hidroxi-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 4,70-4,54 (m, 1H), 4,31 - 4,16 (m, 2H), 3,93 (dd, J = 13, 6 Hz, 1H), 3,09 (d, J = 13 Hz, 1H), 2,90 - 2,75 (m, 1H), 2,63 - 2,39 (m, 4H), 2,13 - 2,01 (m, 1H), 1,83 (dd, J = 14, 6 Hz, 1H), 1,29 (t, J = 7 Hz, 3H).

[0185] Etapla C: (2*R*,7a*S*)-2-Fluoro-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo

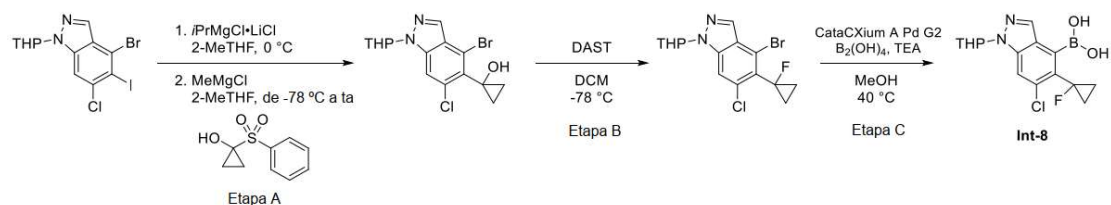
[0186] A una solución de 2-hidroxi-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (100 g, 468 mmol) en DCM (1 l) se le añadió gota a gota DAST (113 g, 703 mmol, 93 ml) a -70 °C en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se calentó a 20 °C y se agitó durante 16 h. La reacción se inactivó mediante la adición de EtOH (50,0 ml) a 10 °C y después se diluyó con agua (300 ml) y se extrajo con DCM (200 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (200 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se combinó a partir de seis reacciones idénticas y se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (Éter de petróleo: Acetato de etilo = de 50:1 a 1:1). Este material se purificó adicionalmente por prep-HPLC (C18, MeCN al 0-100 %/agua con HCl al 0,05 %). La mezcla racémica se resolvió usando SFC quiral (Daicel Chiralpak AS (50 mm x 250 mm, 10 μ m), EtOH con NH₄OH al 0,1 %) para proporcionar (2*R*,7a*S*)-2-fluoro-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (Pico 2). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5,43-5,16 (m, 1H), 4,27 - 4,14 (m, 3H), 3,26 - 3,06 (m, 1H), 2,85 - 2,57 (m, 3H), 2,50 - 2,38 (m, 1H), 2,30 - 2,07 (m, 2H), 1,28 (t, J = 7 Hz, 3H).

[0187] Etapla D: ((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-il)metanol (Int 7)

[0188] Una solución (2*R*,7a*S*)-2-fluoro-5-oxotetrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-carboxilato de etilo (82,0 g, 381 mmol) en THF (300 ml) se añadió a la mezcla de LiAlH₄ (21,7 g,

571 mmol) en THF (520 ml) a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se inactivó mediante la adición de Na₂SO₄·10 H₂O·10 H₂O a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 20 °C durante 0,5 h y después se filtró. La torta de filtración se lavó con EtOAc (600 ml x 5) y el filtrado se secó sobre MgSO₄ anhidro. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un residuo. El residuo en bruto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (SiO₂, DCM: Metanol = de 100:1 a 10:1) para proporcionar ((2*R*,7*aS*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metanol (**Int 7**). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5,34-5,06 (m, 1H), 3,25 (s, 2H), 3,23 - 3,08 (m, 3H), 3,08 - 2,85 (m, 2H), 2,12 - 2,00 (m, 2H), 1,93-1,74 (m, 4H).

[0189] Intermedio 8: Ácido (6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)borónico (Int 8**)**



[0190] Etapa A: 1-(4-Bromo-6-cloro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-5-il)ciclopropan-1-ol

[0191] A una solución de 4-bromo-6-cloro-5-yodo-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol (Etapa F de **Int 4**) (0,202 g, 0,457 mmol) en 2-metil-THF (880 µl) se le añadió cloruro de isopropilmagnesio · cloruro de litio (0,100 g, 0,686 mmol) a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 80 min (Solución A).

[0192] A una solución de 1-(fenilsulfonil)ciclopropan-1-ol (80 mg, 0,387 mmol) en 2-metil-THF (880 ml) se le añadió cloruro de metilmagnesio (123 µl, 0,368 mmol) a -78 °C en atmósfera de nitrógeno. A la mezcla resultante se le añadió Solución A y la mezcla resultante se agitó a -78 °C. Después de 4 h, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se inactivó con agua y después se diluyó con acetato de etilo. La mezcla resultante se lavó con NH₄Cl sat. y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente orgánico se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (acetato de etilo/hexanos = 20/80) para proporcionar 1-(4-bromo-6-cloro-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-5-il)ciclopropan-1-ol. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 371.

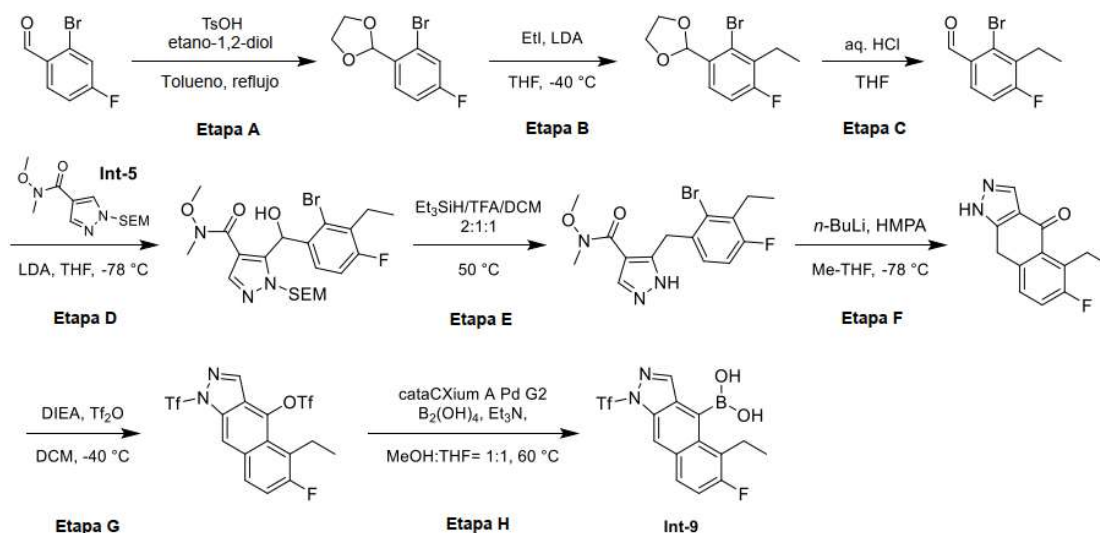
[0193] Etapa B: 4-bromo-6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol

[0194] A una solución de 1-(4-bromo-6-cloro-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-5-il)ciclopropan-1-ol (112 mg, 0,300 mmol) en DCM (2,5 ml) se le añadió DAST (90 µl, 0,681 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 50 min y después se inactivó con NaHCO₃ sat. y la mezcla resultante se extrajo con DCM tres veces. La capa orgánica combinada se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. El disolvente orgánico se retiró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida (acetato de etilo en hexanos, 0-40 %) para proporcionar 4-bromo-6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 373.

[0195] Etapa C: Ácido (6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-4-il)borónico (Int 8)

[0196] A una solución de 4-bromo-6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol (25,1 g, 67,3 mmol) en metanol (220 ml) se le añadieron tetrahidroxidiboro (9,04 g), cataCXio A Pd G2 (2,25 g) y trietilamina (37,2 ml) a ta en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se calentó a 40 °C y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, después los sólidos se filtraron y la torta se lavó con metanol. El filtrado se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NH₄Cl sat, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente orgánico se retiró a presión reducida. El residuo se cristalizó en acetato de etilo en hexanos (10 %) para producir ácido (6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1-(tetrahydro-2H-piran-2-il)-1H-indazol-4-il)borónico (**Int 8**). EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 339.

[0197] Intermedio 9: ácido (5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonil)-1H-benzo[f]indazol-4-il)borónico (Int 9)



[0198] Etapa A: 2-(2-bromo-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano

[0199] A una solución de 2-bromo-4-fluorobenzaldehído (38,9 g, 192 mmol) en tolueno (400 ml) se le añadieron etano-1,2-diol (47,6 g, 767 mmol) y ácido 4-metilbencenosulfónico (1,65 g, 9,59 mmol), y la mezcla de reacción se sometió a reflujo durante 16 h con una trampa Dean-Stark retirando el agua. La mezcla se basificó con Na_2CO_3 (2 eq.) sólido, se agitó durante 5 min, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto, que se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 220 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 3 % en gradiente de éter de petróleo a 80 ml/min) para proporcionar 2-(2-bromo-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano. EM (IEN): m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 247, 249.

[0200] Etapa B: 2-(2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano

[0201] A una solución de 2-(2-bromo-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano (22 g, 89 mmol) y yodoetano (139 g, 890 mmol) en THF (200 ml) se le añadió diisopropilamida de litio (89 ml, 178 mmol, 2 M en THF) a -40 °C en atmósfera de N_2 gota a gota. Después, la mezcla se agitó a -40 °C durante 20 minutos. La mezcla se vertió en NH_4Cl sat. (100 ml) y se extrajo con EtOAc (100 ml x 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (100 ml), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano. El producto se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. EM (IEN): m/z ($\text{M}+\text{H}$)⁺ 275, 277.

[0202] Etapa C: 2-bromo-3-etil-4-fluorobenzaldehído

[0203] A una solución de 2-(2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)-1,3-dioxolano (24,5 g, 89 mmol) en THF (200 ml) se le añadió HCl acuoso (2 M, 100 ml) y la mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se

diluyó con EtOAc (200 ml), se lavó con NaHCO₃ sat. (60 ml) y salmuera (60 ml), y la capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 120 g, Eluyente de gradiente de EtOAc al 5 %/Éter de Pet. a 80 ml/min) para producir 2-bromo-3-etil-4-fluorobenzaldehído. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 231, 233.

[0204] Etapa D: 5-((2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida

[0205] A una solución agitada de *N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (**Int 5**) (3,00 g, 10,5 mmol) en THF (30 ml) se le añadió diisopropilamida de litio (15,8 ml, 31,5 mmol, 2 M en THF) a -78 °C en atmósfera de N₂ y la mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min en atmósfera de N₂. Después se añadió una solución de 2-bromo-3-etil-4-fluorobenzaldehído (2,43 g, 10,5 mmol) en THF (10 ml) a -78 °C, y la reacción se agitó a -78 °C durante 30 min en atmósfera de N₂. La mezcla resultante se vertió en NH₄Cl sat. ac. (40 ml) y se extrajo con EtOAc (50 ml x 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; Columna de sílice ultrarrápida-CS Agela® (40 g), Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-36 %/éter de petróleo a 40 ml/min) para proporcionar 5-((2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida. EM (IEN): m/z (M+Na)⁺ 538, 540.

[0206] Etapa E: 5-(2-bromo-3-etil-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida

[0207] A una solución agitada de 5-((2-bromo-3-etil-4-fluorofenil)(hidroxi)metil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1-((2-(trimetilsilil)etoxi)metil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (6,30 g, 12,2 mmol) en DCM (15 ml) se le añadieron trietilsilano (30 ml, 188 mmol) y TFA (15 ml), y la reacción se agitó a 50 °C durante 16 h. La reacción se concentró a presión reducida y el residuo se diluyó con EtOAc (30 ml), después se vertió en NaHCO₃ sat. ac. (40 ml). La mezcla se separó y la capa acuosa se extrajo con EtOAc (50 ml x 2). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; Columna de sílice ultrarrápida-CS Agela® (40 g), Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 0-100 %/éter de petróleo a 40 ml/min) para proporcionar 5-(2-bromo-

3-etil-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 370, 372.

[0208] Etapa F: 5-etil-6-fluoro-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona

[0209] A una solución de 5-(2-bromo-3-etil-4-fluorobencil)-*N*-metoxi-*N*-metil-1*H*-pirazol-4-carboxamida (1,40 g, 3,78 mmol) y HMPA (0,724 ml, 4,16 mmol) en Me-THF (40 ml) se le añadió gota a gota *N*-butillitio (3,48 ml, 8,70 mmol, 2,5 M en hexano) a -78 °C en atmósfera de N₂ la atmósfera gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de NH₄Cl sat. y ácido L-ascórbico (ac., 20 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se diluyó con DCM (5 ml) y se formó el precipitado. El sólido se recogió por filtración para producir 5-etil-6-fluoro-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 231.

[0210] Etapa G: trifluorometanosulfonato de 5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo

[0211] A una solución de 5-etil-6-fluoro-1,9-dihidro-4*H*-benzo[*f*]indazol-4-ona (600 mg, 2,61 mmol) y ácido L-ascórbico (92 mg, 0,521 mmol) en DCM (10 ml) se le añadió DIEA (4,55 ml, 26,1 mmol) a -40 °C y la mezcla se agitó a -40 °C durante 10 min. Se añadió Tf₂O (4,40 ml, 26,1 mmol) a la mezcla y la mezcla de reacción se agitó a -40 °C en atmósfera de N₂ durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (20 ml), se lavó con agua (10 ml) y salmuera (10 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y el filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 12 g, Eluyente de gradiente de EtOAc al 2 %/Éter de pet. a 20 ml/min) para proporcionar trifluorometanosulfonato de 5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,61 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,89 (dd, *J* = 9,2, 5,6 Hz, 1H), 7,44 (dd, *J* = 9,2, 9,2 Hz, 1H), 3,35 - 3,29 (m, 2H), 1,14 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

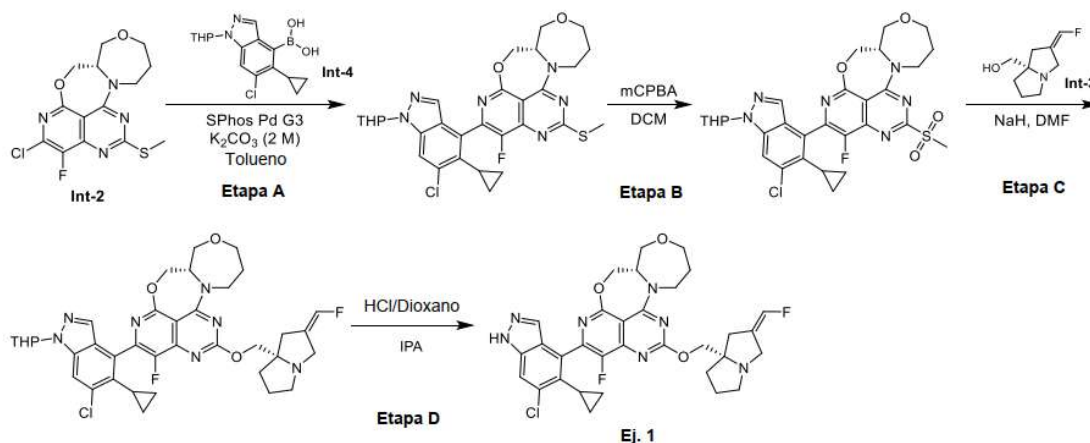
[0212] Etapa H: Ácido (5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)borónico (Int 9)

A una solución de trifluorometanosulfonato de 5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-ilo (50 mg, 0,101 mmol), se le añadieron tetrahidroxidiboro (63,5 mg, 0,708 mmol) y cataCXio A Pd G2 (6,76 mg, 10,1 μmol) en MeOH (1,5 ml) y THF (1,5 ml) TEA (0,042 ml, 0,303 mmol) a 25 °C, y la mezcla se agitó a 60 °C durante 1 h en atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se purificó mediante una placa de TLC preparativa (SiO₂, Éter de pet./EtOAc = 3/1) para proporcionar ácido (5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-

1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)borónico (**Int 9**). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 8,59 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,92 (dd, *J* = 9,2, 5,6 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* = 9,2, 9,2 Hz, 1H), 3,28 - 3,22 (m, 2H), 1,33 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).

Síntesis de ejemplo:

[0213] Ejemplo 1: (8*aS*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahydro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahydro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13*a*-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Ej. 1**)



[0214] Etapa A: (8*aS*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metiltio)-8*a*,9,12,13-tetrahydro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13*a*-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0215] A una solución de (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8*a*,9,12,13-tetrahydro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13*a*-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Int 2**, 200 mg, 0,561 mmol) en tolueno (5 ml) se le añadieron ácido (6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahydro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)borónico (**Int 4**, 270 mg, 0,841 mmol), K₂CO₃ (1,40 ml, 2,80 mmol, 2 M en agua) y metanosulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenil)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (219 mg, 0,280 mmol) a 25 °C en atmósfera de N₂, y la mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 16 h. La mezcla resultante se enfrió, se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con H₂O (10 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 12 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 30 % en éter de petróleo a 30 ml/min) para proporcionar (8*aS*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-

(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 597.

[0216] Etapa B: (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metilsulfonil)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0217] A una solución de (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (660 mg, 1,11 mmol) en DCM (7 ml) se le añadió *m*-CPBA (494 mg, 2,43 mmol, 85 %) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con DCM (120 ml), se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (30 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 12 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 70 % en éter de petróleo a 30 ml/min) para proporcionar (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metilsulfonil)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 629.

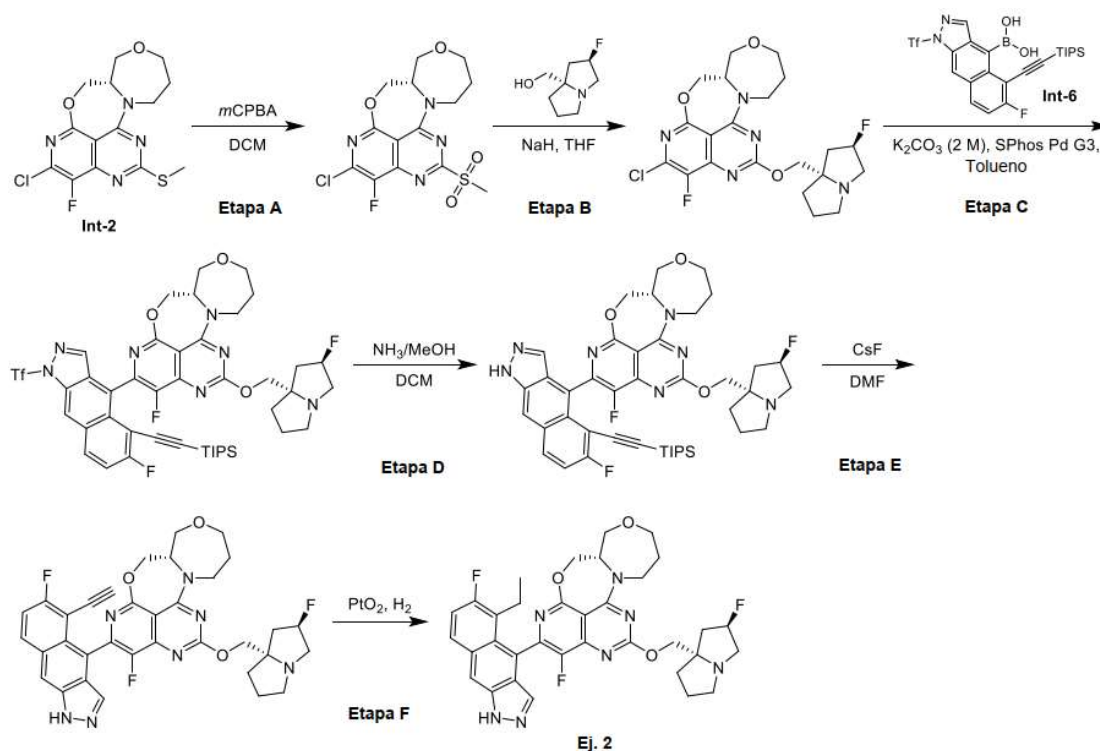
[0218] Etapa C: (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0219] A una solución de (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(metilsulfonil)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (80 mg, 0,127 mmol) y (*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metanol (**Int 3**, sal de HCl) (31,7 mg, 0,153 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió hidruro de sodio (30,5 mg, 0,763 mmol, 60 % en peso) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La reacción se interrumpió con solución de NH₄Cl saturado (4 ml) y después la mezcla resultante se diluyó con EtOAc (20 ml). La fase orgánica se lavó con agua (3 x 4 ml) y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en capa fina preparativa. (SiO₂, DCM:MeOH = 10:1) para proporcionar (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 720.

[0220] Etapa D: (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 1)

[0221] A una solución de (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1-(tetrahidro-2*H*-piran-2-il)-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (67 mg, 0,093 mmol) en IPA (0,5 ml) se le añadió HCl (2 ml, 4,00 mmol, 2 M en dioxano) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 15 h. El disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se disolvió en MeCN (1 ml) y se basificó con NH₃·H₂O (cáncer 1 M en MeCN) a pH 7. La mezcla resultante se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa (Columna: Boston Prime C18 150 x 30 mm x 5 µm; Condición: Agua (NH₃·H₂O al 0,05 % + NH₄HCO₃)-ACN 10 mM; Inicio de B-Fin de B: 44-74; Tiempo de gradiente (min): 10; 100 % de B Tiempo de retención (min): 2; Caudal (ml/min): 25) para proporcionar (8a*S*)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1*H*-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 636. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 7,96-7,79 (m, 1H), 7,75 (s, 1H), 6,85 - 6,38 (m, 1H), 5,30 - 5,16 (m, 1H), 4,76 (d, *J* = 10,3 Hz, 1H), 4,66 - 4,57 (m, 1H), 4,45 - 4,26 (m, 3H), 4,26 - 4,15 (m, 1H), 4,06 - 3,94 (m, 1H), 3,93 - 3,73 (m, 2H), 3,65 - 3,55 (m, 1H), 3,48 (d, *J* = 14,7 Hz, 2H), 3,23 - 3,05 (m, 1H), 2,85 - 2,58 (m, 2H), 2,46 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 2,29 - 1,82 (m, 7H), 0,91 (dd, *J* = 14,6, 4,7 Hz, 1H), 0,70 (s, 1H), 0,35-0,09 (m, 2H).

[0222] Ejemplo 2: (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 2)



[0223] Etapa A: (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0224] A una solución de (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (**Int 2**, 400 mg, 1,12 mmol) en CH₂Cl₂ (5 ml) se le añadió *m*-CPBA (501 mg, 2,47 mmol, 85 % en peso) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con DCM (80 ml), se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (20 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 4 g, Eluyente de gradiente de acetato de etilo al 15 % en éter de petróleo a 30 ml/min) para proporcionar (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 389.

[0225] Etapa B: (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0226] A una solución de (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (290 mg, 0,746 mmol) y ((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metanol (**Int 7**) (594 mg, 3,73 mmol) en THF (3 ml) se añadió NaH (149 mg, 3,73 mmol, 60 % en peso) a 25 °C. La mezcla se

agitó a 25 °C durante 1 h. La reacción se interrumpió con solución saturada de NH₄Cl (8 ml), se extrajo con EtOAc (2 x 15 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 4 g, Eluyente de gradiente de MeOH al 5 % en DCM a 30 ml/min) para proporcionar (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 468.

[0227] Etapas C: (8aS)-4-fluoro-5-(6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etynil)-1H-benzo[f]indazol-4-yl)-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0228] A una solución de (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (115 mg, 0,246 mmol) en tolueno (1,5 ml) se le añadieron ácido (6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etynil)-1H-benzo[f]indazol-4-yl)borónico (**Int 6**, 160 mg, 0,295 mmol), K₂CO₃ (0,614 ml, 1,23 mmol, 2 M en agua) y metanosulfonato de (2-diciclohexilfosfino-2',6'-dimetoxibifenilo)[2-(2'-amino-1,1'-bifenil)]paladio(II) (96 mg, 0,123 mmol) a 25 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 40 °C durante 16 h. La mezcla se enfrió, se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con H₂O (5 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (SiO₂, DCM: MeOH = 10:1) para proporcionar (8aS)-4-fluoro-5-(6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etynil)-1H-benzo[f]indazol-4-yl)-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 930.

[0229] Etapas D: (8aS)-4-fluoro-5-(6-fluoro-5-((triisopropilsilil)etynil)-1H-benzo[f]indazol-4-yl)-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0230] A una solución de (8aS)-4-fluoro-5-(6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-5-((triisopropilsilil)etynil)-1H-benzo[f]indazol-4-yl)-2-(((2R,7aS)-2-fluorotetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (110 mg, 0,118 mmol) en DCM (2 ml) se le añadió amoníaco (4 ml, 28,0 mmol, 7 M en MeOH) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante

15 h. La mezcla de reacción se purificó directamente por TLC preparativa (SiO₂, DCM:MeOH = 10:1) para proporcionar (8a*S*)-4-fluoro-5-(6-fluoro-5-((triiisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 798.

[0231] Etapa E: (8a*S*)-5-(5-etnil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

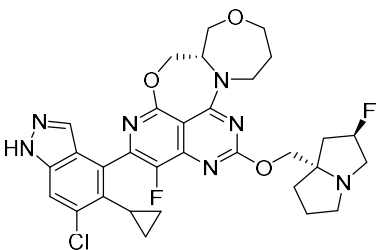
[0232] A una solución de (8a*S*)-4-fluoro-5-(6-fluoro-5-((triiisopropilsilil)etnil)-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (70 mg, 0,088 mmol) en DMF (1 ml) se le añadió CsF (67 mg, 0,441 mmol) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h. La mezcla se filtró y el disolvente se purificó directamente por HPLC preparativa de fase inversa (Columna: Phenomenex Gemini-NX 150 x 30 mm x 5 µm; Condición: agua (NH₄HCO₃-10 mM)-ACN; Inicio de B-Fin de B: 37-67; Tiempo de gradiente (min): 11; 100 % de B Tiempo de retención (min): 2,5; Caudal (ml/min): 25) para proporcionar (8a*S*)-5-(5-etnil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN): *m/z* (M+H)⁺ 642. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,24 (s, 1H), 8,14 (dd, *J* = 9,3, 5,8 Hz, 1H), 8,08 - 7,93 (m, 1H), 7,38 - 7,33 (m, 1H), 5,39 - 5,16 (m, 2H), 4,71 (dd, *J* = 12,5, 3,8 Hz, 1H), 4,62 - 4,58 (m, 1H), 4,42 - 4,28 (m, 2H), 4,27 - 4,12 (m, 2H), 4,03 - 3,92 (m, 1H), 3,89 - 3,83 (m, 1H), 3,70 - 3,51 (m, 2H), 3,50 - 3,34 (m, 1H), 3,30 - 3,12 (m, 3H), 3,04 - 2,98 (m, 1H), 2,39 - 2,09 (m, 4H), 2,04-1,81 (m, 4H).

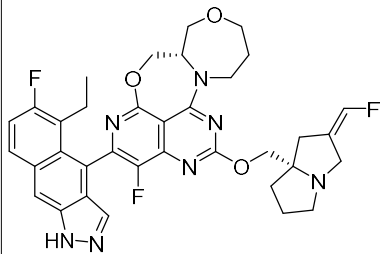
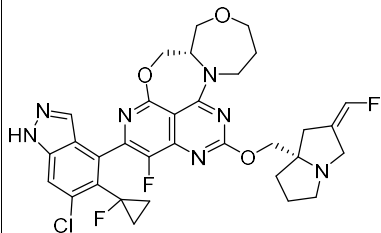
[0233] Etapa F: (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 2)

[0234] A una solución de (8a*S*)-5-(5-etnil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (20 mg, 0,031 mmol) en MeOH (10 ml) se le añadió óxido de platino (IV) (5 mg, 0,022 mmol) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 2 h en atmósfera de H₂ (0,1034 MPa (15 psi)). La mezcla se diluyó con MeOH (30 ml), se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa de fase inversa. (Columna: Boston Prime C18 150 x

30 mm x 5 μ m; Condición: Agua (NH₃H₂O al 0,05 % + NH₄HCO₃ 10 mM)-ACN; Inicio de B-Fin de B: 42-72; Tiempo de gradiente (min): 10; 100 % de B Tiempo de retención (min): 2; Caudal (ml/min): 25) para proporcionar (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Ej. 2**). EM (IEN): m/z (M+H)⁺ 646. ¹H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,21 (s, 1H), 7,99 (dd, J = 9,3, 6,0 Hz, 1H), 7,90 - 7,76 (m, 1H), 7,34 - 7,29 (m, 1H), 5,41 - 5,06 (m, 2H), 4,77 - 4,73 (m, 1H), 4,63 (dd, J = 13,3, 6,0 Hz, 2H), 4,38 (dd, J = 9,5, 5,2 Hz, 1H), 4,33 - 4,25 (m, 2H), 4,20 (dd, J = 12,4, 4,2 Hz, 1H), 4,04 - 4,00 (m, 1H), 3,93 - 3,75 (m, 1H), 3,67 - 3,58 (m, 1H), 3,49 (dd, J = 16,9, 10,5 Hz, 1H), 3,25 - 3,19 (m, 2H), 3,06 - 2,98 (m, 1H), 2,65 - 2,45 (m, 2H), 2,29 - 2,11 (m, 4H), 2,04 - 1,96 (m, 3H), 1,90 (s, 1H), 0,97-0,90 (m, 3H).

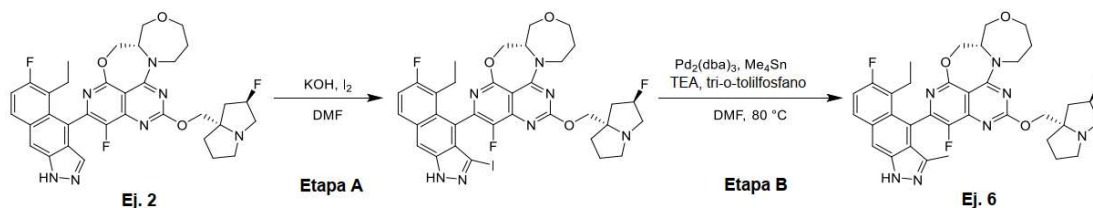
[0235] Los ejemplos en la tabla a continuación se sintetizaron usando un procedimiento similar al descrito en las síntesis de **Ej. 1** y **Ej. 2** haciendo las sustituciones apropiadas para el material de partida, intermedios y/o reactivos. Dichos materiales de partida, intermedios y/o reactivos están disponibles en el mercado, se sintetizan como se describe en la literatura, se sintetizan usando métodos disponibles para un experto en la materia o se sintetizan como se describe en el presente documento.

Ej.	Estructura	Nombre	RMN	EM (IEN) [M+H] ⁺
Ej. 3		(8a <i>S</i>)-5-(6-cloro-5-ciclopropil-1 <i>H</i> -indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2 <i>R</i> ,7a <i>S</i>)-2-fluorotetrahidro-1 <i>H</i> -pirrolizin-7a(5 <i>H</i>)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8- <i>ab</i>]heptaleno	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13,25-13,19 (m, 1H), 7,84 - 7,74 (m, 2H), 5,37 - 5,18 (m, 1H), 5,04 - 4,95 (m, 1H), 4,71 - 4,62 (m, 1H), 4,54 (dd, J = 12,9, 7,1 Hz, 1H), 4,38 - 4,27 (m, 1H), 4,18 - 4,00 (m, 3H), 3,93 - 3,85 (m, 1H), 3,78 - 3,56 (m, 1H), 3,52 - 3,34 (m, 2H), 3,13 - 2,98 (m, 3H), 2,87 - 2,78 (m, 1H), 2,19 - 1,71 (m, 9H), 0,84 - 0,76 (m, 1H), 0,67 - 0,57 (m,	624

			1H), 0,23-0,00 (m, 2H).	
Ej. 4		(8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxo-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno	¹ H RMN (400 MHz, MeOD) δ 8,20 (s, 1H), 7,98 (dd, <i>J</i> = 9,3, 6,1 Hz, 1H), 7,83 (d, <i>J</i> = 27,6 Hz, 1H), 7,33 - 7,28 (m, 1H), 6,65 (d, <i>J</i> = 84,4 Hz, 1H), 5,29 - 5,19 (m, 1H), 4,77 - 4,72 (m, 1H), 4,63 - 4,60 (m, 2H), 4,41 - 4,26 (m, 3H), 4,19 (dd, <i>J</i> = 12,3, 4,2 Hz, 1H), 4,07 - 3,93 (m, 1H), 3,92 - 3,73 (m, 2H), 3,67 - 3,54 (m, 1H), 3,53 - 3,39 (m, 2H), 3,24 - 3,12 (m, 1H), 2,79 - 2,70 (m, 2H), 2,65 - 2,54 (m, 1H), 2,46 (d a, <i>J</i> = 15,6 Hz, 1H), 2,26 - 2,07 (m, 2H), 2,05 - 1,82 (m, 4H), 1,01-0,85 (m, 3H).	658
Ej. 5		(8aS)-5-(6-cloro-5-(1-fluorociclopropil)-1H-indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometileno)tetrahidro-1H-pirrolizina-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxo-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno	¹ H RMN (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 13,48-13,42 (m, 1H), 7,89 - 7,83 (m, 2H), 6,86 - 6,64 (m, 1H), 5,02 - 4,95 (m, 1H), 4,70 - 4,63 (m, 1H), 4,57 - 4,51 (m, 1H), 4,38 - 4,27 (m, 1H), 4,15 - 4,03 (m, 3H), 3,93 - 3,85 (m, 1H), 3,76 - 3,56 (m, 2H), 3,52 - 3,35 (m, 2H), 3,30 - 3,24 (m, 1H), 3,03 - 2,95 (m, 1H), 2,60 - 2,52 (m, 2H), 2,35 - 2,28 (m, 1H), 2,06 - 1,66 (m, 6H), 1,51 -	654

			1,34 (m, 1H), 1,14 - 1,03 (m, 1H), 0,75- 0,52 (m, 2H).	
--	--	--	--	--

[0236] Ejemplo 6: (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 6)



[0237] Etapa A: (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno.

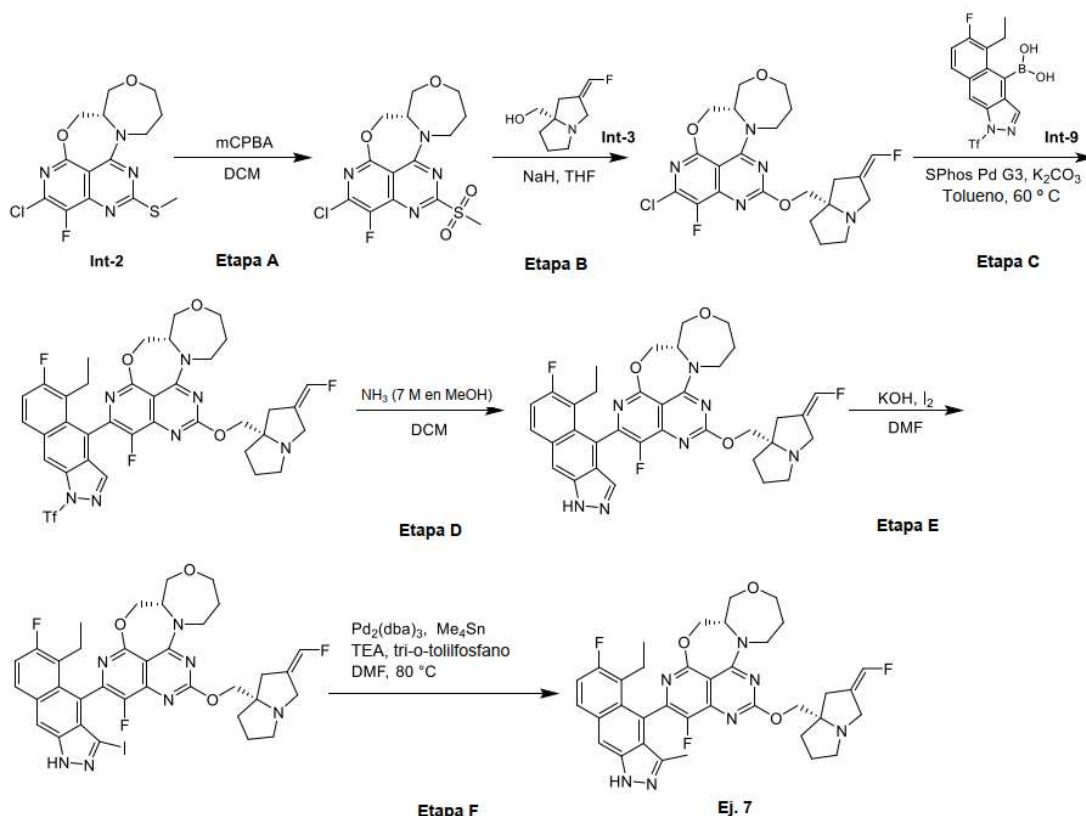
[0238] A una solución de (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (350 mg, 0,542 mmol) en DMF (5 ml) se le añadieron KOH (122 mg, 2,168 mmol) e I₂ (413 mg, 1,626 mmol) a 20 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. La mezcla se diluyó con agua (5 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 5 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 4 g, Eluyente de gradiente de MeOH al 0~10 %/CH₂Cl₂ a 40 ml/min) para proporcionar (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN) [M+H]⁺: *m/z* 772.

[0239] Etapa B: (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 6)

[0240] A una solución de (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7a*S*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-

tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (200 mg, 0,259 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron trietilamina (157 mg, 1,56 mmol), Pd₂(dba)₃ (47,5 mg, 0,052 mmol), tri-*o*-tolilfosfano (31,6 mg, 0,104 mmol) y tetrametilestanano (130 mg, 0,727 mmol) a 20 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 80 °C durante 12 h. La mezcla se diluyó con agua (2 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 2 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El residuo se purificó mediante HPLC-prep (Columna: Boston Green ODS 150 x 30 mm, 5 µm; Condición: agua (FA al 0,2 %)-ACN; Inicio 25 % de B; Fin 55 % de B; Caudal 25 ml/min) para obtener el producto en bruto. El producto en bruto se separó mediante SFC preparativa (Columna: DAICEL CHIRALCEL OJ (250 mm x 30 mm, 10 µm), Condición: CO₂-EtOH (NH₃H₂O al 0,1 %), Inicio de B: 40 %; Fin de B: 40 %; Tiempo de gradiente (min): 10; 100 % de B Tiempo de retención: 1; Caudal (ml/min: 80; Inyecciones: 30) para proporcionar (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((2*R*,7*aS*)-2-fluorotetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Ej. 6**). EM (IEN) [M+H]⁺: *m/z* 660. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD) δ 8,15 (s, 1H), 7,97 (dd, *J* = 9,1, 5,8 Hz, 1H), 7,32 (dt, *J* = 9,2, 3,5 Hz, 1H), 5,40 - 5,24 (m, 2H), 4,84 - 4,77 (m, 1H), 4,72 - 4,64 (m, 1H), 4,47 - 4,39 (m, 1H), 4,37 - 4,28 (m, 2H), 4,25 - 4,19 (m, 1H), 4,07 - 3,99 (m, 1H), 3,87 - 3,78 (m, 1H), 3,62 (dt, *J* = 8,4, 3,7 Hz, 1H), 3,56 - 3,42 (m, 2H), 3,29 - 3,22 (m, 2H), 3,11 - 3,00 (m, 1H), 2,79 - 2,44 (m, 2H), 2,30 - 2,13 (m, 4H), 2,06 - 1,98 (m, 5H), 1,91 (s, 2H), 0,99 - 0,91 (m, 3H).

[0241] Ejemplo 7: (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Ej. 7**)



[0242] Etapa A: (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0243] A una solución de (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(metiltio)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (**Int 2**, 500 mg, 1,40 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) se le añadió *m*-CPBA (711 mg, 3,50 mmol, 85 % en peso) a 0 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 20 °C durante 1 h. La mezcla se inactivó con Na₂SO₃ sat. ac. (5 ml) y NaHCO₃ sat. ac. (5 ml), se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 5 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno en bruto. EM (IEN) [M+H]⁺: *m/z* 389.

[0244] Etapa B: (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometil)etrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0245] A una solución de (*S*)-5-cloro-4-fluoro-2-(metilsulfonyl)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (400 mg, 1,03 mmol) y (*S,Z*)-(2-(fluorometil)etrahidro-1*H*-pirrolizina-7a(5*H*)-il)metanol (**Int 3**, sal de HCl, 214 mg, 1,03 mmol) en DMF (4.5 ml) se le añadió NaH (206 mg, 5,14 mmol) (60 % en aceite mineral) a 0 °C en atmósfera de N₂, la mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 1 h. La

reacción se inactivó con NH_4Cl ac. (5 ml) y se extrajo con EtOAc (10 ml x 3). La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®, columna ultrarrápida Agela de 20 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 10/1$) para proporcionar (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno. EM (IEN) $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 480.

[0246] Etapas C: (8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0247] A una solución de (S)-5-cloro-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (250 mg, 0,521 mmol) y ácido (5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1H-benzo[f]indazol-4-il)borónico (**Int 9**, 264 mg, 0,677 mmol) en tolueno (6 ml) se le añadieron K_2CO_3 ac. (2 M, 1,30 ml, 2,60 mmol) y SPhos Pd G3 (122 mg, 0,156 mmol) a 20 °C en atmósfera de N_2 . La mezcla se agitó a 60 °C durante 2 h. La mezcla se enfrió, se diluyó con agua (2 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 6 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®, columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 80 g, Eluyente de gradiente de THF al 0-80 %/éter de pet. a 40 ml/min) para proporcionar (8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno. EM (IEN) $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 790.

[0248] Etapas D: (8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno

[0249] A una solución de (8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1-((trifluorometil)sulfonyl)-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8H,11H-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-ab]heptaleno (200 mg, 0,253 mmol) en DCM (0,1 ml) se le añadió NH_3/MeOH (7 M, 2 ml, 14,0 mmol) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 12 h. La mezcla se evaporó a presión reducida para proporcionar (8aS)-5-(5-etil-6-fluoro-1H-benzo[f]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((S,Z)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1H-pirrolizin-7a(5H)-il)metoxi)-8a,9,12,13-

tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno en bruto. EM (IEN) [M+H]⁺: *m/z* 658.

[0250] Etapas E: (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno

[0251] A una solución de (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (167 mg, 0,254 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron KOH (57,0 mg, 1,02 mmol) e I₂ (193 mg, 0,762 mmol) a 25 °C. La mezcla se agitó a 25 °C durante 30 min. La mezcla se inactivó con Na₂SO₃ sat. ac.

(3 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 3 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar el producto en bruto. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (ISCO®; columna ultrarrápida de sílice SepaFlash® de 4 g, Eluyente de gradiente de CH₂Cl₂ al 0-30 %/MeOH a 20 ml/min) para proporcionar (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN) [M+H]⁺: *m/z* 784.

[0252] Etapas F: (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (Ej. 7)

[0253] A una solución de (8*aS*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-yodo-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S,Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7*a*(5*H*)-il)metoxi)-8*a*,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno (130 mg, 0,166 mmol) en DMF (2 ml) se le añadieron trietilamina (101 mg, 0,995 mmol), Pd₂(dba)₃ (30,4 mg, 0,033 mmol) y tri-*o*-tolilfosfano (20,2 mg, 0,066 mmol) y tetrametilestanano (89 mg, 0,498 mmol) a 20 °C en atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a 80 °C durante 12 h. La mezcla se diluyó con agua (2 ml), se extrajo con EtOAc (3 x 2 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante TLC preparativa (SiO₂, CH₂Cl₂: MeOH =10 :1) para proporcionar un producto en bruto. El producto en bruto se separó mediante SFC preparativa (Columna: DAICEL CHIRALCEL OD (250 mm x 30 mm, 10 µm), Condición: CO₂-EtOH (NH₃H₂O al 0,1 %), Inicio de B: 60 %; Fin de B: 60 %; Tiempo de gradiente (min): 10; 100 % de B Tiempo de retención: 10; Caudal (ml/min): 80; Inyecciones: 35) para proporcionar el producto separado. Después, el producto separado se volvió a purificar mediante HPLC preparativa

inversa (Columna: Boston Prime C18 150 x 30 mm x 5 μ m; Condición: Agua ($\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ al 0,05 % + NH_4HCO_3 10 mM)-ACN; Inicio de B--Fin de B: 50--80; Tiempo de gradiente (min): 11; 100 % de B Tiempo de retención (min): 2,5; Caudal (ml/min): 25) para proporcionar (8a*S*)-5-(5-etil-6-fluoro-3-metil-1*H*-benzo[*f*]indazol-4-il)-4-fluoro-2-(((*S*,*Z*)-2-(fluorometilen)tetrahidro-1*H*-pirrolizin-7a(5*H*)-il)metoxi)-8a,9,12,13-tetrahidro-8*H*,11*H*-7,10-dioxa-1,3,6,13a-tetraazanafto[1,8-*ab*]heptaleno. EM (IEN) $[\text{M}+\text{H}]^+$: m/z 672. ^1H RMN (400 MHz, CD_3OD) δ 8,27 - 8,08 (m, 1H), 7,96 (dd, $J = 9,2, 6,1$ Hz, 1H), 7,31 (m, 1H), 6,88 - 6,49 (m, 1H), 5,27 (m, 1H), 4,82 - 4,74 (m, 1H), 4,66 (d, $J = 13,2$ Hz, 1H), 4,46 - 4,29 (m, 3H), 4,25 - 4,18 (m, 1H), 4,09 - 3,95 (m, 1H), 3,92 - 3,76 (m, 2H), 3,68 - 3,56 (m, 1H), 3,53 - 3,37 (m, 2H), 3,23 - 3,11 (m, 1H), 2,81 - 2,71 (m, 2H), 2,70 - 2,30 (m, 3H), 2,29 - 2,13 (m, 2H), 2,13 - 1,80 (m, 7H), 0,95 (td, $J = 18,7, 7,4$ Hz, 3H).

Ensayos

[0254] Procedimiento para el ensayo de intercambio de nucleótidos catalizado por SOS para KRAS-TS, G12C/D/V/A/R/S, G13D, Q61H, HRAS-TS y NRAS-TS

[0255] La proteína KRAS-G12C recombinante utilizada en este ensayo tiene una triple mutación adicional (C51S/C80L/C118S). Mientras que KRAS-TS, G12D/V/A/S/R, G13D, Q61H, HRAS y NRAS están en el contexto de sus antecedentes de secuencia de proteína TS. Específicamente, el ensayo de intercambio de nucleótidos catalizado por SOS utiliza un complejo de TR-FRET preformado que contiene una proteína RAS biotinilada específica (KRAS-TS, G12C/V/D/A/S/R, G13D, Q61H, HRAS-TS, NRAS-TS; descrita anteriormente) con Bodipy-GDP y Terbio-estreptavidina. Los compuestos se preincuban con este complejo durante 60 minutos. Posteriormente, se añaden proteína SOS humana recombinante y GTP sin marcar para iniciar la reacción de intercambio. Los inhibidores de molécula pequeña estabilizan el complejo Bodipy-GDP, mientras que la proteína sin tratar intercambia rápidamente Bodipy-GDP por GTP sin marcar, dando como resultado una señal de TR-FRET reducida.

[0256] Para ensamblar los complejos de TR-FRET preformados, cada proteína RAS biotinilada se diluye a 2 μ M en un tampón de EDTA (HEPES 20 mM pH 7,5, cloruro de sodio 50 mM, EDTA 10 mM y Tween al 0,01 %) y se incuba a temperatura ambiente durante una hora. Después, esta mezcla se diluye adicionalmente a 90 nM en un tampón de ensayo (HEPES 20 mM pH 7,5, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 10 mM y Tween al 0,005 %) que contiene 15 nM de terbio-estreptavidina (Invitrogen, N.º de catálogo

PV3577) y 900 nM de Bodipy-GDP (Invitrogen, N.º de catálogo G22360) y se incuban a temperatura ambiente durante seis horas. Cabe señalar que este complejo de TR-FRET preformado para cada una de las proteínas RAS se hizo con anticipación, se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C hasta el día del experimento.

[0257] Cada compuesto de ensayo (solución madre 10 mM en DMSO) se diluye en DMSO para fabricar una dilución final de 10 puntos, de 3 veces, y se dispensa acústicamente en una placa de ensayo de 384 pocillos (Corning, N.º de catálogo 3820) usando un Echo 550 (Labcyte). Cada pocillo de la placa de ensayo recibe 3 µl de un complejo de TR-FRET preformado 3x RAS específico y 3 µl de tampón de ensayo y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos (tiempo de preincubación). Después, cada pocillo recibe 3 µl de proteína SOS humana recombinante 3x y GTP (Sigma, G8877) en tampón de ensayo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos (G13D), 60 minutos (KRAS TS/G12C/D, H/NRAS) o 90 minutos para G12A/R/S/V y Q61H. La reacción final en cada pocillo de 9 µl consiste en GTP 3mM, proteínas Ras y SOS específicas en las siguientes concentraciones: KRAS-G12C/SOS = 3 nM/40 nM, KRAS-TS y G12D/SOS = 1 nM/40 nM, KRAS-G12V/SOS = 1,25 nM/160 nM, KRAS-G12A/S/SOS = 1 nM/160 nM, KRAS-G12R/SOS = 1 nM/320 nM, KRAS-Q61H/SOS = 1 nM/320 nM, KRAS-G13D/SOS = 1,25 nM/0 nM, HRAS-TS y NRAS-TS = 1,25 nM/40 nM.

[0258] La señal de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) se mide en un lector de placas Envision (PerkinElmer): Filtro de excitación = 340 nm; emisión1 = 495 nm; emisión2 = 520 nm; espejo dicróico = D400/D505; tiempo de retardo = 100 ms. La señal de cada pocillo se determina como la relación de la emisión a 520 nm a la de 495 nm. El efecto porcentual de cada pocillo se determina después de la normalización a pocillos de control que contienen DMSO (sin efecto) o una concentración de saturación de inhibidor (efecto máximo). El efecto aparente en función de la concentración del compuesto se ajusta a una ecuación logística de cuatro parámetros.

[0259] Procedimiento para el ensayo de fosfo-ERK celular en estirpes celulares de tipo silvestre y mutante (G12D, G12V) de KRAS

[0260] Se cultivaron células MKN-1 (JCRB JCRB0252) que contenían KRAS de tipo silvestre amplificado, en medio de crecimiento que contenía RPMI 1640-GlutaMAX™-I (ThermoFisher Scientific 61870) que contenía un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (ThermoFisher Scientific 10091148), piruvato de sodio 1 mM y HEPES 10 mM. Se cultivaron células AsPC-1 (ATCC® CRL-1682™), que contenían la mutación de activación

de KRAS-G12D homocigota, en matraces T150 en medio de crecimiento (medio RPMI 1640-GlutaMAX™-I (ThermoFisher Scientific 61870) que contenía suero bovino fetal al 10 % (ThermoFisher Scientific 10091148)). Se cultivaron células SW620 (ATCC® CRL-227™), que contenían la mutación de activación de KRAS-G12V homocigota, en medio de crecimiento que contenía RPMI 1640-GlutaMAX™-I (ThermoFisher Scientific 61870) que contenía un 10 % de suero bovino fetal inactivado por calor (ThermoFisher Scientific 10091148).

[0261] Las células para el ensayo se recogieron en medio de crecimiento después de la digestión con TrypLE (ThermoFisher Scientific 12604021) y se sembraron en una placa de cultivo celular recubierta con colágeno de 384 pocillos (Corning 356702) a una densidad de 10.000 -15.000 células/20 µl/pocillo, y se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante la noche. Se prepararon las valoraciones de dosis-respuesta del compuesto (con una concentración de solución madre de 10 mM) [concentración final del ensayo de detección de ERK 30 µM y diluciones 1:3, respuesta de dosis de 10 puntos] y se dispensaron cantidades apropiadas (270 nl) de compuestos de ensayo en una placa intermedia de 384 pocillos usando un manipulador de líquidos Echo 550. Se añadieron 30 µl/pocillo de medio RPMI 1640-GlutaMAX™-I a la placa intermedia y el contenido de la placa intermedia (10 µl/pocillo) se transfirió después a la placa de cultivo celular recubierta con colágeno de 384 pocillos, que se incubó a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 2 h. Después de retirar el medio de la placa de cultivo celular recubierta con colágeno, las células se lisaron en tampón de lisis de p-ERK Alpha SureFire® Ultra™ Multiplex y kit de ensayo de ERK total (PerkinElmer MPSU-PTERK) que contenía cóctel de inhibidor de proteasa y fosfatasa Halt™ (ThermoFisher Scientific 78446) a temperatura ambiente con agitación constante a 300 rpm durante 30 minutos. Los lisados celulares después se transfirieron a una placa OptiPlate-384 (PerkinElmer 6005620), y la fosforilación de ERK (p-ERK) y los niveles de ERK totales se detectaron mediante el kit de p-ERK Alpha SureFire® Ultra™ Multiplex y kit de ensayo de ERK total (PerkinElmer MPSU-PTERK) siguiendo el protocolo del fabricante. Las placas de ensayo se leyeron en un lector de placas multimodo EnVision (PerkinElmer) y la relación de p-ERK frente a ERK total en cada pocillo se usó como lectura final. Las curvas de respuesta a la dosis se analizaron usando un modelo logístico de 4 parámetros para calcular los valores de CI₅₀ usando el software Spotfire.

[0262] Los resultados de estos ensayos se presentan en las tablas a continuación.

N.º de ej.	CI50 de GNE de KRA S G12 D (nM)	CI50 de GNE de KRA S G12 V (nM)	CI50 de GNE de KRA S TS (nM)	CI50 de GNE de KRA S G12 C (nM)	CI50 de GNE de KRA S G13 D (nM)	CI50 de GNE de HRA S (nM)	CI50 de GNE de NRA S (nM)	CI50 de GNE de KRA S G12 A (nM)	CI50 de GNE de KRA S G12S (nM)	CI50 de GNE de KRA S G12 R (nM)	CI50 de GNE de KRA S Q61 H (nM)
Ej. 1	0,67	1,3	0,87	6,9	3,7	> 110 60	> 110 60	< 0,6 9	< 0,6 9	< 0,6 9	1,4
Ej. 2	0,65	1,3	1,1	3,2	1,0	2743	7022	< 0,6 9	< 0,6 9	< 0,6 9	1,2
Ej. 3	1,3	3,0	2,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ej. 4	< 0,6 9	0,83	< 0,6 9	2,9	0,89	1275	2818	< 0,6 9	< 0,6 9	< 0,6 9	1,0
Ej. 5	< 0,6 9	0,98	< 0,6 9	3,3	1,2	4684	> 110 60	0,83	0,77	1,3	0,97
Ej. 6	1,3	1,5	1,6	6,5	1,9	5516	1005 0	1,0	1,2	1,2	1,8
Ej. 7	1,4	2,8	1,4	11	2,4	2180	8979	1,3	1,3	1,3	2,8

N.º de ej.	CI50 de pERK de AsPC1 (nM)	CI50 de pERK de SW620 (nM)	CI50 de pERK de MKN1 (nM)
Ej. 1	5,1	2,6	9,1
Ej. 2	7,4	2,4	7,9
Ej. 3	15	3,9	9,7
Ej. 4	2,2	< 1,5	6,6
Ej. 5	3,2	1,3	4,3
Ej. 6	9,5	3,4	14
Ej. 7	7,1	2,5	12

[0263] Procedimiento para estudios farmacocinéticos IV/VO en ratas

[0264] Se determinaron los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para el aclaramiento, el volumen de distribución, la semivida y la biodisponibilidad oral en ratas a partir de estudios de administración oral y administración IV. Se sometieron a ayuno 4 ratas macho, que normalmente pesan 225 – 260 g, durante la noche antes de la dosificación. Los compuestos se prepararon para la dosificación oral e IV mediante la adición a un vehículo como se muestra en la tabla a continuación. La formulación IV se administró a 2 ratas a través de la vena yugular precanulada y la dosificación oral se administró a 2 ratas a través de una sonda oral. Se recogió sangre por una arteria precanulada, normalmente a predosis, 2, 8, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 y 8 h después de la dosis para IV, y a predosis, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 h para la dosificación oral. Se recogieron muestras en tubos K2EDTA, se almacenaron en hielo y se centrifugaron. Se transfirió plasma a una placa de microtitulación y se almacenó a -70 °C hasta el análisis. Se extrajeron muestras de plasma usando precipitación de proteínas y se

analizaron mediante separación por cromatografía de líquidos seguida de detección por espectrometría de masas (CL-EM/EM), usando una curva patrón para cada compuesto. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para los datos de dosificación IV y oral mediante métodos no compartimentales. La biodisponibilidad oral se determinó como la relación del área de plasma normalizada por dosis bajo la curva (ABC) después de la dosificación oral frente a la dosificación IV.

[0265] En la tabla a continuación se muestran vehículo, dosis, volumen de dosis y concentración.

	Vehículo		Dosis [mg/kg]		Volumen de dosis [ml/kg]		Conc. [mg/ml]	
	IV	VO	IV	V O	IV	V O	IV	V O
Ej . 1	DMSO/PG/H ₂ O (20/60/20)	TWEEN80/PG/H ₂ O (10/40/50)	1	2	1	5	1	0,4
Ej . 2	DMSO/PG/H ₂ O (20/60/20)	DMSO/PG/H ₂ O (20/60/20)	1	2	1	5	1	0,4
Ej . 3	DMSO/PG/H ₂ O (20/60/20)	TWEEN80/PG/H ₂ O (10/40/50)	1	2	1	5	1	0,4
Ej . 6	DMSO/PG/H ₂ O (20/60/20)	TWEEN80/PG/H ₂ O (10/40/50)	1	2	1	5	1	0,4
Ej . 7	Captisol al 30 %	Tween 80 al 10 %	1	2	1	2	1	1,0

[0266] Procedimiento para estudios farmacocinéticos IV/VO en perro

[0267] Se determinaron los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para el aclaramiento, el volumen de distribución, la semivida, el tiempo de residencia medio (TRM) y la biodisponibilidad oral en perros a partir de estudios de administración oral y administración IV. Se sometieron a ayuno 4 perros macho, que normalmente pesan 8-12 kg, durante la noche antes de la dosificación. Los compuestos se prepararon para la dosificación oral e IV mediante la adición a un vehículo como se muestra en la tabla a continuación. La formulación IV se administró a 2 perros a través de la vena safena o cefálica, y la dosificación oral se administró a 2 perros a través de una sonda oral. Se recogió sangre por la vena cefálica o yugular, normalmente a predosis, 2, 8, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis para IV, y a predosis, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h para la dosificación oral. Se recogieron muestras en tubos K2EDTA, se almacenaron en hielo y se centrifugaron. Se transfirió plasma a una placa de microtitulación y se almacenó a -70 °C hasta el análisis. Se extrajeron muestras de plasma usando precipitación de proteínas y se analizaron mediante separación por cromatografía de

líquidos seguida de detección por espectrometría de masas (CL-EM/EM), usando una curva patrón para cada compuesto. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para los datos de dosificación IV y oral mediante métodos no compartimentales. La biodisponibilidad oral se determinó como la relación del área de plasma normalizada por dosis bajo la curva (ABC) después de la dosificación oral frente a la dosificación IV.

[0268] En la tabla a continuación se muestran vehículo, dosis, volumen de dosis y concentración.

	Vehículo		Dosis [mg/kg]		Volumen de dosis [ml/kg]		Conc. [mg/ml]	
	IV	VO	IV	V O	IV	V O	IV	V O
Ej . 1	DMSO/PG/H ₂ O (20/40/40)	TWEEN80 al 10 %	0,2 5	0,5	1	2	0,2 5	0,2 5
Ej . 2	DMSO/PG/H ₂ O (20/40/40)	TWEEN80 al 10 %	0,0 5	0,5	1	2	0,0 5	0,2 5
Ej . 3	DMSO/PG/H ₂ O (20/40/40)	TWEEN80/PG/H ₂ O (10/40/50)	0,2 5	0,5	1	5	0,2 5	0,1
Ej . 6	Captisol al 30 %	TWEEN80 al 10 %	0,2 5	0,5	1	2	0,2 5	0,2 5

[0269] Procedimiento para estudios farmacocinéticos de casete IV en perro

[0270] Se determinaron los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para el aclaramiento, el volumen de distribución, la semivida y el tiempo de residencia medio (TRM) en perros a partir de estudios de administración por casete IV. Se sometieron a ayuno 2 perros macho, que normalmente pesan 8-12 kg, durante la noche antes de la dosificación. Los compuestos se prepararon para la dosificación oral e IV mediante la adición a un vehículo como se muestra en la tabla a continuación. La formulación IV se administró a 2 perros a través de la vena safena o cefálica. Se recogió sangre por la vena cefálica o yugular, normalmente a predosis, 2, 8, 15, 30 min, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h después de la dosis. Se recogieron muestras en tubos K2EDTA, se almacenaron en hielo y se centrifugaron. Se transfirió plasma a una placa de microtitulación y se almacenó a -70 °C hasta el análisis. Se extrajeron muestras de plasma usando precipitación de proteínas y se analizaron mediante separación por cromatografía de líquidos seguida de detección por espectrometría de masas (CL-EM/EM), usando una curva patrón para cada compuesto. Se calcularon los parámetros farmacocinéticos plasmáticos mediante métodos no compartimentales.

[0271] En la tabla a continuación se muestran vehículo, dosis, volumen de dosis y concentración.

	Vehículo	Dosis [mg/kg]	Volumen de dosis [ml/kg]	Conc. [mg/ml]
Ej. 7	DMSO/PEG400/H ₂ O (20/40/40)	0,05	0,5	0,1

[0272] Los resultados de los estudios farmacocinéticos se presentan en la tabla a continuación.

	Ej. 1		Ej. 2		Ej. 3		Ej. 6		Ej. 7	
Especie	Rata	Perr o	Rata	Perr o	Rat a	Perr o	Rat a	Perr o	Rat a	Perr o
CLp [ml/min/kg]	24	5,0	40	18	40	10	36	8,0	35	7,7
Vd [l/kg]	2,0	0,65	6,1	2,6	4,0	2,2	5,1	3,7	4,0	1,4
TRM [h]	1,4	2,2	2,5	2,4	1,7	3,6	2,4	7,8	1,9	3,1
% de F	11	17	10	29	7,5	15	18	59	15	ND

[0273] Procedimiento para estudios de PKPD con modelo de xenoinjerto AsPC-1

[0274] El efecto de los inhibidores sobre la inhibición de pERK se evaluó en el modelo de xenoinjerto de AsPC-1 usando SCID de NOD hembra (6-8 semanas de edad, Charles River Laboratories). Se implantaron ratones con células tumorales AsPC-1 en Matrigel al 100 % (5×10^6) por vía subcutánea en el flanco. Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño promedio de $\sim 250 \text{ mm}^3$ los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento y se inició la administración del artículo de ensayo o vehículo (Tween-80 al 5 %). Las formulaciones de solución se prepararon mediante la adición de Tween-80 al 5 % al material y la acidificación a pH 2-5 usando HCl 2 N. Las formulaciones se administraron usando un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Todos los compuestos se administraron por sonda oral y en puntos temporales predeterminados después de la administración del compuesto, los animales se sacrificaron, se recogió sangre de la vena yugular y se resecaron y congelaron tumores rápidamente.

[0275] Se recogieron muestras de sangre en tubos K2EDTA, se almacenaron en hielo y se centrifugaron. Se transfirió plasma a una placa de microtitulación y se almacenó a -70 °C

hasta el análisis. Se extrajeron muestras de plasma usando precipitación de proteínas y se analizaron mediante separación por cromatografía de líquidos seguida de detección por espectrometría de masas (CL-EM/EM), usando una curva patrón para cada compuesto.

[0276] Las muestras de tumor recién congeladas se pesaron en tubos Lysis Matrix H (MP Biomedicals) y después se lisaron usando un tampón de lisis completo recién preparado (Tris Lysis Buffer, PMSF, SDS) de los kits de ensayo Fosfo-ERK1/2 y Fosfo/ERK1/2 Total (Meso Scale Discovery) complementados con inhibidor de proteasa/fosfatasa (ThermoFisher). Todas las muestras se homogeneizaron (Qiagen TissueLyser II) en tubos Lysis Matrix H durante 5 minutos a 4 °C, después se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes de lisado se recogieron en tubos de centrifuga limpios de 1,5 ml para ultrasonidos. Se midieron las concentraciones de proteína total de las muestras, y todas las muestras se diluyeron usando tampón de lisis completo (descrito anteriormente) a la misma concentración (≥ 3 mg/ml). Los intervalos lineales de las entradas de proteínas totales para placas de MSD se optimizaron a través de un experimento piloto para cada estudio usando diluciones de lisados de proteínas totales de 2-3 muestras representativas tratadas con vehículo y con compuesto. Después de la determinación de la concentración de proteína optimizada para cada placa de MSD, todas las muestras se diluyeron en tampón de lisis completo (descrito anteriormente) a la concentración de proteína optimizada seguido de la carga de cantidades iguales de muestra en placas de MSD. Los ensayos de MSD Fosfo-ERK1/2 y Fosfo/Total ERK1/2 se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante. La señal de fosfo-ERK sola o las señales de fosfo-ERK y ERK total se midieron usando un lector de placas MSD (Meso Scale Discovery). La señal de fosfo-ERK relativa para cada muestra se calculó de acuerdo con el protocolo del fabricante, incluyendo las etapas de normalización de fondo y de ERK total. Los niveles de fosfo-ERK porcentuales se calcularon normalizando la señal de fosfo-ERK relativa para cada muestra a la señal de fosfo-ERK relativa promedio para todas las muestras de control de vehículo por punto temporal.

[0277] Los resultados de los estudios de PKPD con Ej. 1, Ej. 2 y Ej. 6 se muestran en las FIG. 1, 2 y 3, respectivamente.

[0278] Procedimiento para estudios de eficacia de 14 días con modelo de xenoinjerto AsPC-1

[0279] La estirpe celular AsPC-1 se obtuvo de la American Type Culture Collection y se cultivó en el medio recomendado. Todos los procedimientos experimentales con animales

fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de Merck antes de su realización. Durante el estudio, el cuidado y el uso de animales se realizó de acuerdo con las regulaciones de la Asociación para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio (AAALAC). Se adquirieron ratones hembra NOD SCID de 6 a 8 semanas de edad en Charles River Laboratories (Wilmington, MA) y se mantuvieron en un entorno sin patógenos. Todos los animales recibieron comida y agua a demanda. Los animales se inocularon por vía subcutánea en el flanco inferior derecho con 5×10^6 células AsPC-1 (100 % Matrigel, Corning, 356237). Las mediciones de volumen tumoral se determinaron usando la fórmula $0,5 \times L \times W^2$ en la que L se refiere a la longitud y W se refiere al ancho de cada tumor. Los tumores resultantes crecieron a aproximadamente 250 mm^3 de tamaño antes de iniciar el tratamiento. Los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento (10 ratones/grupo) y se trataron con artículo de ensayo o vehículo (Tween-80 al 5 %). Los artículos de ensayo se prepararon mediante la adición de Tween-80 al 5 % al material y la acidificación a pH 2-5 usando HCl 2 N. Las formulaciones se administraron usando un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Todos los compuestos se administraron por sonda oral dos veces al día durante 14 días. Los pesos de los tumores y corporales se midieron dos veces por semana.

[0280] Los resultados de los estudios de eficacia de 14 días con Ej. 2 y Ej. 6 se muestran en las FIG. 4 y 5, respectivamente.

[0281] Secuencias

[0282] SEQ ID NO: 1 – KRAS G12C humana recombinante

[0283] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGACGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETSLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLLVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDPVPMVLVGNKSDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0284] SEQ ID NO: 2 – KRAS G12D humana recombinante

[0285] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGADGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDPVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0286] SEQ ID NO: 3 – KRAS G12V humana recombinante

[0287] GLNDIFEAQKIEWHETEKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0288] SEQ ID NO: 4 – KRAS G13D humana recombinante

[0289] GLNDIFEAQKIEWHETEKLVVVGAGDVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEVPMVLVGNKCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0290] SEQ ID NO: 5 – HRAS TS humana recombinante

[0291] GGGGSHMTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQV
VIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHQYREQIK
RVKDSDDVPMVLVGNKCDLAARTVESRQAQDLARSYGIPYIETSAKTRQGVEDAF
YTLVREIRQH

[0292] SEQ ID NO: 6 – NRAS TS humana recombinante

[0293] GGGGMTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVID
GETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNSKSFADINLYREQIKRV
KDSDDVPMVLVGNKCDLPTRTVDTKQAHELAKSYGIPFIETSAKTRQGVEDAFYTL
VREIRQYRMKKLN

[0294] SEQ ID NO: 7 – Proteína SOS1 humana recombinante

[0295] MGSSHHHHHHSGENLYFQGSSGLNDIFEAQKIEWHESSEEQMRLPSADVYR
FAEPDSEENIIFEENMQPKAGIPIKAGTVIKLIERLTYHMYADPNFVRTFLTTRYRSFC
KPQELLSLIERFEIPEPEPTADRIAIENGDQPLSAELKRFRKEYIQPVQLRVNLVCR
HWVEHHFYDFERDAYLLQRMEEFIGTVRGKAMKKWVESITKIIQRKKIARDNGPG
HNITFQSSPPTVEWHISRPGHITFDLLTLHPIEIARQLTLLESDLYRAVQPSELVGSV
WTKEDKEINSPNLLKMIRHTTNLTWFKECIVETENLEERVAVVSRHIEILQVFQELN
NFNGVLEVVSAMNSSPVYRLDHTFEQIPSRQKKILEEAHELSEDHYKKYLAKLRSIN
PPCVPFPGIYLTNLIKTEEGNPEVLKRHGKELINFSKRRKVAEITGEIQYQNPYCL
RVESDIKRFFENLNPMGNSMEKEFTDYLFNKSLEIEPRNPKPLPRFPKKYSYPLKSPG
VRPSNPRPGT

[0296] SEQ ID NO: 8 – KRAS TS humana recombinante

[0297] GGGGTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYRKQVVIDG
ETCLLDILDITAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHYREQIKRVK

DSEDVPMVLVGKNCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQGVDDAFYTLV
REIRKHKEK

[0298] SEQ ID NO: 9 – KRAS G12A humana recombinante

[0299] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGAAAGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDVPMVLVGKNCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0300] SEQ ID NO: 10 – KRAS G12S humana recombinante

[0301] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGASGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDVPMVLVGKNCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0302] SEQ ID NO: 11 – KRAS G12R humana recombinante

[0303] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGARGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGQEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDVPMVLVGKNCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK

[0304] SEQ ID NO: 12 – KRAS Q61H humana recombinante

[0305] GLNDIFEAQKIEWHETAYKL VVVGAGGVGKSALTIQLIQNHVDEYDPTIED
SYRKQVVIDGETCLLDILDTAGHEEYSAMRDQYMRTGEGFLCVFAINNTKSFEDIH
HYREQIKRVKDSSEDVPMVLVGKNCDLPSRTVDTKQAQDLARSYGIPFIETSAKTRQ
GVDDAFYTLVREIRKHKEK