

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 780**

51 Int. Cl.:
A61K 31/352 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
C07D 405/02 (2006.01)
C07D 311/78 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06851064 .3**
96 Fecha de presentación: **29.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1965790**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Metabolitos de análogos de wortmanina y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:
30.12.2005 US 755477 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.04.2012

73 Titular/es:
**Arizona Board of Regents, Acting on Behalf of
The University of Arizona
888 N. Euclid Ave., Rm. 204
Tucson, AZ 85721, US**

72 Inventor/es:
POWIS, Garth

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 378 780 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Metabolitos de análogos de wortmanina y métodos de uso de los mismos

ANTECEDENTES

5 La presente divulgación se refiere a análogos de wortmanina y sus metabolitos, y tiene aplicación en métodos para usar estos derivados para inhibir la actividad de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI-3-quinasa) y para tratar ciertos tumores malignos.

10 Las PI-3 quinasa son una familia de enzimas relacionadas que son capaces de fosforilar el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de inositol del fosfatidilinositol. Están ligadas a una lista diversa de funciones celulares, incluyendo el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la movilidad, la supervivencia celulares y el tráfico intracelular. Muchas de estas funciones se refieren a la capacidad de las PI-3 quinasa para activar la proteína quinasa B (Akt). La desactivación farmacológica y genética de la isoforma p110 δ de la PI-3 quinasa ha revelado que esta enzima es importante para la función de células T, células B, células cebadas y neutrófilos. De ahí que se considere que p110 δ es una diana prometedoras para fármacos que se dirigen a prevenir o tratar la inflamación y la autoinmunidad y el rechazo de trasplantes. La evidencia reciente ha mostrado que el gen que codifica la isoforma p110 α de la PI-3 quinasa está mutado en una gama de cánceres humanos. Por ejemplo, la mutación de p110 α que conduce a la sobreexpresión de la quinasa se encuentra en el cáncer de pulmón humano. También se encuentra que la actividad de PI-3 quinasa es elevada en cánceres ováricos, de cabeza y cuello, del tracto urinario, de colon y cervicales. Además, una fosfatasa (PtdIns(3,4,5)P₃) que antagoniza la actividad de PI-3 quinasa está ausente o está mutada en una variedad de cánceres humanos, incluyendo cánceres avanzados de próstata, endometriales, renales, gliales, melanoma y pulmonares microcíticos. Así, la inhibición de la actividad de PI-3 quinasa puede proporcionar una diana potencial para el tratamiento de ciertos cánceres humanos.

25 La wortmanina es un compuesto presente en la naturaleza aislado de caldos de cultivo del hongo *Penicillium Wortmannin* que tiene la estructura básica mostrada en la Patente de EE. UU. N° 5.480.906. La wortmanina inhibe irreversiblemente PI-3-quinasa a través de la interacción covalente con una lisina específica sobre la quinasa: Lys⁸⁰² del bolsillo que se une a ATP del sitio catalítico de la isoforma p110 α o Lys⁸⁸³ de la isoforma p110 δ . La mayoría de las isoformas de PI-3 quinasa, tales como p110 α , p110 β , p110 δ y p110 γ , por ejemplo, son inhibidas igualmente por la wortmanina. Sin embargo, la wortmanina demuestra toxicidad hepática y hematológica, y es una molécula biológicamente inestable. Muestras almacenadas como soluciones acuosas bien a 37°C o bien a 0°C a pH neutro están sometidas a descomposición por apertura hidrolítica del anillo de furano. Se ha mostrado que la electrofilia del anillo de furano es fundamental para la actividad inhibidora de la wortmanina. La inhibición irreversible de PI-3-quinasa se produce mediante la formación de una enamina después del ataque de la lisina activa de la quinasa en el anillo de furano en la posición C(20) de la wortmanina. Así, la descomposición de la wortmanina puede interferir con su actividad inhibidora sobre PI-3 quinasa.

35 Análogos de wortmanina que presentan estabilidad biológica mejorada y toxicidad sistémica reducida pueden proporcionar un tratamiento mejorado para el cáncer y actuar como agentes antitumorales. De acuerdo con esto, lo que se necesita son análogos de wortmanina y sus metabolitos que presenten estabilidad biológica incrementada y toxicidad reducida.

WO2007/008200 divulga metabolitos de PX-866, pero no sugiere que tales compuestos puedan formularse como una composición farmacéutica.

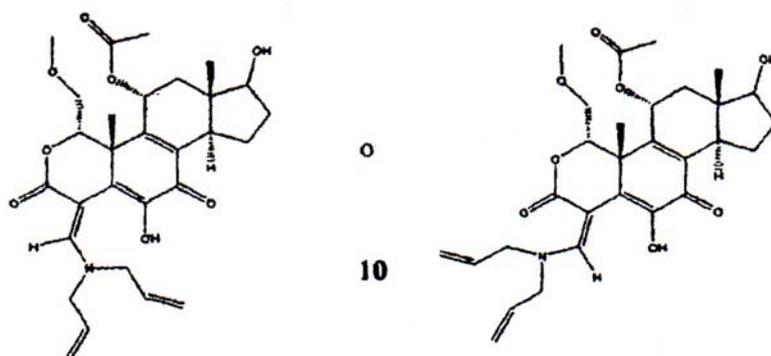
40 WO 2006/044453 divulga 17-hidroxi-PX-867.

WO 2003/024183 describe análogos de wortmanina que tienen un grupo ceto en la posición 17 para el uso en el tratamiento del cáncer, y EP 658343 describe otros análogos de 17-hidroxi-wortmanina.

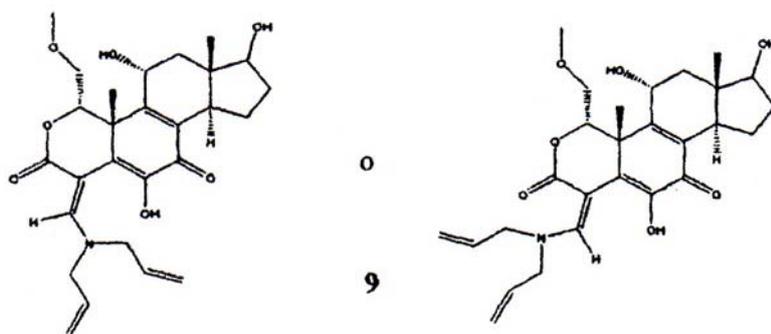
G: SUMARIO

45 La presente divulgación se refiere a metabolitos de wortmanina y metabolitos de análogos de wortmanina y a su uso para inhibir PI-3 quinasa, tratar y prevenir el crecimiento de tumores y tratar el cáncer.

Una realización de la divulgación proporciona un compuesto de estructura 10:



Una realización adicional de la divulgación proporciona un compuesto de estructura 9:



5 Otra realización de la divulgación proporciona utilidad para inhibir la actividad de PI-3 quinasa en mamíferos que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz del compuesto de estructura 10. Una realización adicional de la divulgación proporciona utilidad para inhibir la actividad de PI-3 quinasa en mamíferos que comprende administrar a un mamífero una cantidad eficaz del compuesto de estructura 9.

10 Otra realización de la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de PI-3 quinasa en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el compuesto de estructura 10, con lo que el compuesto inhibe la PI-3 quinasa. Una realización adicional de la divulgación proporciona un método para inhibir la actividad de PI-3 quinasa en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el compuesto de estructura 9, con lo que el compuesto inhibe la PI-3 quinasa.

15 Puesto que la actividad de PI-3 quinasa puede ser un factor en ciertos tipos de cánceres, la presente divulgación también proporciona el uso de los compuestos como agentes antitumorales, agentes anticancerosos, y el uso de composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de tales tumores o cánceres. Como tal, una realización adicional de la divulgación proporciona el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de estructura 10. El cáncer tratado mediante el compuesto de estructura 10 puede ser cáncer de colon. Otra realización de la divulgación proporciona utilidad en el tratamiento del cáncer, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de estructura 9. El cáncer tratado mediante el compuesto de estructura 9 puede ser cáncer de colon.

25 Realizaciones de la divulgación también proporcionan una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de estructura 10, y uno de sus vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Realizaciones adicionales de la divulgación proporcionan una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de estructura 9, y uno de sus vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención pueden usarse para tratar la proliferación de células tumorales o el crecimiento de células tumorales, comprendiendo administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de estructura 10 o de un compuesto de estructura 9.

H: BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 Para una mejor comprensión de la divulgación y para mostrar como puede hacerse efectiva la misma, se hará referencia ahora a los dibujos adjuntos. Se subraya que los pormenores mostrados son solo a modo de ejemplo y solo con propósitos de un análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente divulgación, y se

presentan debido a lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y los aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se intentan mostrar detalles experimentales de la invención con más detalle del que es necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada con los dibujos haciendo evidente para los expertos en la especialidad cómo pueden encarnarse en la práctica las varias formas de la invención. En los dibujos adjuntos:

- 5
- La **FIG. 1** ilustra fórmulas para estructuras de un análogo de wortmanina y metabolitos comparativos.
- La **FIG. 2** ilustra fórmulas para estructuras de un análogos de wortmanina y metabolitos comparativos.
- La **FIG. 3** ilustra fórmulas para estructuras del análogo de wortmanina PX-866 y metabolitos de acuerdo con la presente divulgación.
- 10 La **FIG. 4** ilustra la estabilidad relativa del análogo de wortmanina PX-866 cuando se almacena a una concentración de 1 mg/ml durante 24 horas en diversos sistemas tamponadores.
- La **FIG. 5** ilustra un perfil de separación de cromatografía líquida de resolución ultraalta (UPLC) para PX-866 en metanol. Una inyección de 2 ng de PX-866 (en 2 μ l) se eluye como un pico a los 0,742 minutos que está muy separado de la línea de referencia. La relación de señal a ruido está por encima de 10.000. La respuesta del detector estaba saturada y, por encima de 2,0 unidades de absorbancia, era a escala completa. La anchura del pico a la semialtura es < 2 segundos.
- 15 La **FIG. 6A** ilustra la absorbancia única para PX-866 entre 300-340 nm. Las espectrografías UV muestran un intervalo de absorbancia UV para PX-866 con un máximo de λ a 310 nm (parte superior), en comparación con una matriz en blanco sin pico correspondiente (parte inferior).
- 20 La **FIG. 6B** ilustra un perfil de separación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para PX-866 según se detecta a la longitud de onda máxima de 310 nm. Una inyección de 5,3 nMol mostraba un tiempo de retención para PX-866 de 8,68 min. No se observan picos por encima de la línea de referencia a ese tiempo de retención para una inyección de blanco.
- La **FIG. 6C** ilustra la identificación de metabolitos de PX-866 mediante un perfil de separación de HPLC (detectado a 310 nm). Pueden identificarse cuatro metabolitos (M N° 1-4), después de la terminación de una incubación de 60 minutos. El área del pico de absorbancia UV es la mayor para el metabolito N° 1 (tiempo de retención del M N° 1 en la columna (TR) = 8,55 min) en comparación con los picos de elución previos, M N° 2 (TR = 6,86 min), M N° 3 (TR = 6,54 min), y el M N° 4 que se eluye posteriormente (TR = 9,47 min).
- 25 La **FIG. 6D** ilustra perfiles de espectros de masas de metabolitos de wortmanina identificados mediante la separación por HPLC mostrada en la **FIG. 6C**. La m/z de los M N° 1-2 es 528,2690, M N° 3 es 528,2783 y M N° 4 es 468,2399 después del análisis mediante cromatografía de masas/espectrometría de masas de tiempo de vuelo (LC/MS-TOF).
- 30 La **FIG. 7A** ilustra la capacidad de dos metabolitos de un análogo de wortmanina (PX-866) de la presente divulgación para inhibir la activación dependiente del factor de crecimiento epidérmico de Akt que se mide en células de cáncer de colon HT-29. Se muestra una hibridación western usando anticuerpos anti-fosfo-Ser⁴⁷³-Akt.
- 35 La **FIG. 7B** ilustra la capacidad de dos metabolitos de un análogo de wortmanina (PX-866) de la presente divulgación para inhibir la activación dependiente del factor de crecimiento epidérmico de Akt que se mide en células de cáncer de colon HT-29. Se muestran datos cuantificados procedentes de una exploración densitométrica de la hibridación western de la **FIG. 7A** expresados como una relación de fosfo-Ser⁴⁷³-Akt a Akt total como un porcentaje frente al control sin fármaco: (□) 17-hidroxi-PX-866 (PX-866-2) y (◆) 11-desacetilado,17-hidroxi-PX-866 (PX-866-1).
- 40 La **FIG. 8** ilustra la citotoxicidad de metabolitos de PX-866 (PX-866-1 y PX-866-2) de la presente divulgación para células de cáncer de colon HT-29: (○) PX-866; (□) PX-866-2; (◆) PX-866-1.
- La **FIG. 9A** ilustra la inhibición de la señalización de PI-3 quinasa recombinante (p110 α /p85 α bovina recombinante) mediante PX-866 y sus metabolitos: (○) PX-866, (●) wortmanina, (□) PX-866-2 o (◆) PX-866-1.
- 45 La **FIG. 9B** ilustra la inhibición de la señalización de PI-3 quinasa recombinante (p110 β /p85 α bovina recombinante) mediante PX-866 y sus metabolitos: (○) PX-866, (●) wortmanina, (□) PX-866-2 o (◆) PX-866-1.

I: DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 5 Antes de que se describan las composiciones y los métodos presentes, ha de entenderse que esta invención no está limitada a los procedimientos, las composiciones o las metodologías particulares descritos, ya que estos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en la descripción tiene el propósito de describir solamente las versiones o realizaciones particulares, y no está destinada a limitar el alcance de la presente invención que solo estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.
- 10 También debe apuntarse que, según se usan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)", y "el (la)" incluyen la referencia plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a una "célula" es una referencia a una o más células y sus equivalentes conocidos por los expertos en la especialidad, etc. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que son entendidos comúnmente por un experto normal en la especialidad. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o las pruebas de las realizaciones de la presente invención, se describen ahora los métodos, dispositivos y materiales preferidos.
- 15 Según se usa en la presente memoria, el término "aproximadamente" significa más o menos 10% del valor numérico del número con el que se está usando. Por lo tanto, aproximadamente 50% significa en el intervalo de 45%-55%. Puede considerarse que "opcional" u "opcionalmente" significa que la estructura, el episodio o la circunstancia descritos subsiguientemente pueden o no presentarse, y que la descripción incluye casos en los que los episodios se presentan y casos en los que no.
- 20 "Administrar", cuando se usa junto con un agente terapéutico, significa administrar un agente terapéutico sistémicamente o localmente, como directamente dentro de o sobre un tejido diana, o administrar un agente terapéutico a un paciente, con lo que el agente terapéutico impacta positivamente en el tejido al que se dirige. Así, según se usa en la presente memoria, el término "administrar", cuando se usa junto con un análogo de wortmanina o su metabolito, puede incluir, pero no se limita a, proporcionar un análogo de wortmanina o su metabolito sistémicamente a un paciente mediante, p. ej., inyección intravenosa, con lo que el agente terapéutico alcanza el tejido o las células diana. "Administrar" una composición puede realizarse mediante inyección, administración tópica y administración oral o mediante otros métodos solos o en combinación con otras técnicas conocidas. Tales técnicas de combinación incluyen calentamiento, radiación y ultrasonidos.
- 25 El término "animal", según se usa en la presente memoria, incluye, pero no se limita a, seres humanos y vertebrados no humanos tales como animales salvajes, domésticos y de granja. Los términos "paciente" y "sujeto" son intercambiables y puede considerarse que significan cualquier organismo vivo que pueda ser tratado con compuestos de la presente divulgación. Como tales, los términos "paciente" y "sujeto" pueden incluir, pero no se limitan a, cualquier mamífero no humano, cualquier primate o un ser humano.
- 30 El término "inhibir" incluye la administración de un compuesto de la presente divulgación para evitar el comienzo de síntomas, atenuar síntomas o eliminar la enfermedad, afección o trastorno.
- 35 Por "farmacéuticamente aceptable", se entiende que el vehículo, diluyente o excipiente debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no perjudicial para su receptor.
- 40 El término "composición farmacéutica" significará una composición que comprende al menos un ingrediente activo, con lo que la composición es susceptible de investigación con respecto a un resultado eficaz especificado en un mamífero (por ejemplo, sin limitación, un ser humano). Los expertos normales en la especialidad entenderán y apreciarán las técnicas apropiadas para determinar si un ingrediente activo tiene un resultado eficaz deseado basándose en las necesidades del especialista.
- 45 Según se usa en la presente memoria, el término "agente terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, atenuar, prevenir o mejorar una afección o enfermedad de un paciente no deseada. En parte, las realizaciones de la presente divulgación se dirigen al tratamiento del cáncer o la disminución en la proliferación de células.
- 50 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz", según se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca una respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano que esté siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico, que incluye una o más de las siguientes: (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que pueda estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que no experimenta o presenta ya la patología o sintomatología de la enfermedad, (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o presentando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener el desarrollo

adicional de la patología y/o sintomatología), y (3) atenuar la enfermedad: por ejemplo, atenuar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o presentando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, invertir la patología y/o sintomatología). Como tal, un ejemplo no limitativo de una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de una composición de la presente divulgación puede usarse para inhibir, bloquear o invertir la activación, migración o proliferación de células o para tratar eficazmente el cáncer o atenuar los síntomas del cáncer.

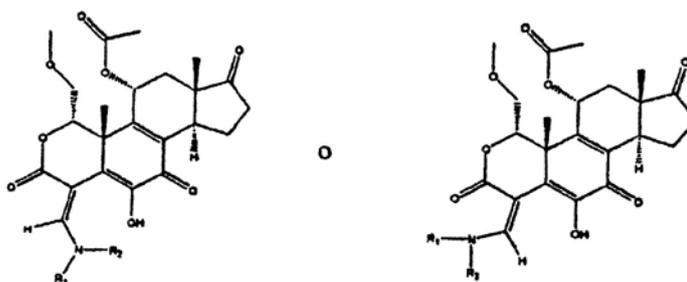
La actividad contemplada por los presentes métodos incluye tratamiento terapéutico y/o profiláctico médico, según sea apropiado. La dosis específica de un compuesto administrado de acuerdo con esta invención para obtener efectos terapéuticos y/o profilácticos, por supuesto, estará determinada por las circunstancias particulares que rodeen el caso, incluyendo, por ejemplo, el compuesto administrado, la ruta de administración y la afección que se trate. Los compuestos son eficaces a lo largo de un amplio intervalo de dosificación y, por ejemplo, las dosificaciones diarias estarán normalmente dentro del intervalo de 0,001 a 100 mg/kg, más habitualmente en el intervalo de 0,01 a 1 mg/kg. Sin embargo, se entenderá que la cantidad eficaz administrada será determinada por el médico a la luz de las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección que ha de tratarse, la elección del compuesto que ha de administrarse y la ruta de administración elegida, y por lo tanto los intervalos de dosificación anteriores no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la invención. Una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de esta invención es típicamente una cantidad tal que, cuando se administra en una composición de excipiente fisiológicamente tolerable, es suficiente para alcanzar una concentración sistémica o concentración local eficaz en el tejido.

Los términos "tratar", "tratado" o "tratando", según se usan en la presente memoria, se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o frenar (aminorar) una afección, trastorno o enfermedad fisiológicos no deseados, o para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de síntomas; disminución de la extensión de la afección, trastorno o enfermedad; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad; retardo en el comienzo o frenado del avance de la afección, trastorno o enfermedad; atenuación del estado de la afección, trastorno o enfermedad; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable, o mejoría o mejora de la afección, trastorno o enfermedad. Tratamiento incluye provocar una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. Tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Realizaciones de la presente invención proporcionan nuevos metabolitos de wortmanina y metabolitos de análogos de wortmanina así como métodos para inhibir el cáncer en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto una cantidad farmacéuticamente eficaz de tales análogos de wortmanina y metabolitos de wortmanina y análogos de wortmanina.

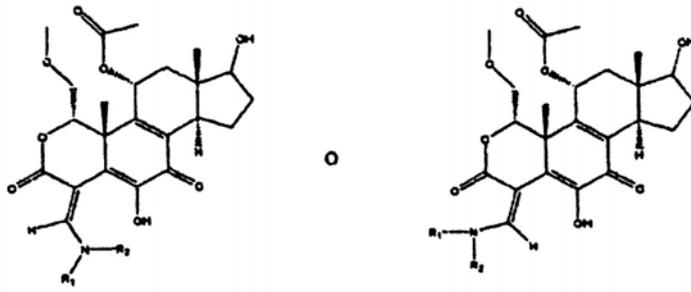
Otras realizaciones de la presente invención también proporcionan métodos para inhibir la actividad de PI-3-quinasa en mamíferos mediante la administración de una cantidad eficaz de uno de los compuestos de esta divulgación. Puesto que la actividad de PI-3-quinasa es un factor en ciertos tipos de cáncer, la invención también proporciona el uso de los compuestos como agentes anticancerosos (antitumorales), y composiciones farmacéuticas que incluyen los compuestos en combinación con vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La **FIG. 1** ilustra fórmulas comparativas para análogos de wortmanina ejemplares y sus metabolitos que pueden ser útiles de acuerdo con la presente invención. La formulación de análogos de wortmanina es muy conocida en la especialidad, como lo es el proceso de fermentación. Un experto normal en la especialidad puede usar esquemas sintéticos y de síntesis para formular compuestos de fórmula 1, 2 o 3 en la **FIG. 1**, según se muestra.



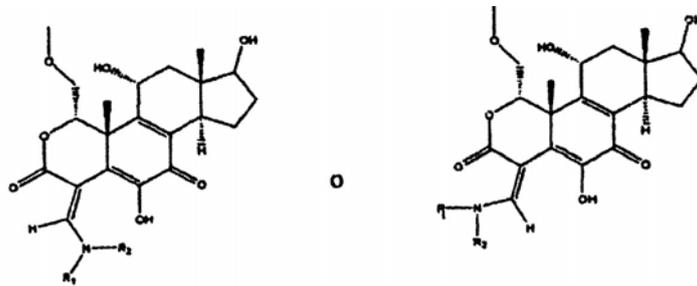
Fórmula 1

en la que R1 y R2 son alquilo insaturado, alquilo saturado, alquilo no lineal, alquilo ramificado, alquilo sustituido o alquilo cíclico;



Fórmula 2

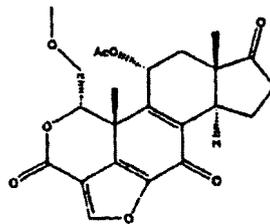
en la que R1 y R2 son alquilo insaturado, alquilo saturado, alquilo no lineal, alquilo ramificado, alquilo sustituido o alquilo cíclico;



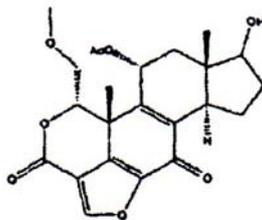
Fórmula 3

en la que R1 y R2 son alquilo insaturado, alquilo saturado, alquilo no lineal, alquilo ramificado, alquilo sustituido o alquilo cíclico.

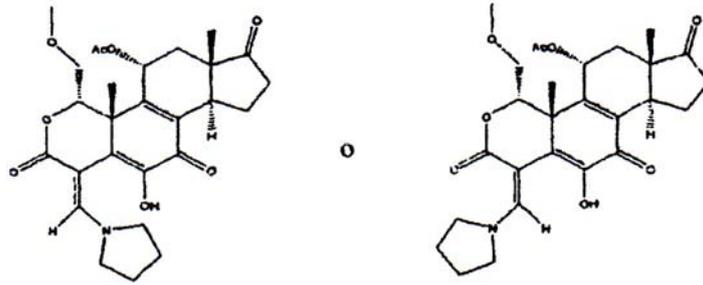
10 Compuestos comparativos adicionales tienen una estructura química correspondiente a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las estructuras 4-7, según se muestra en la FIG. 2.



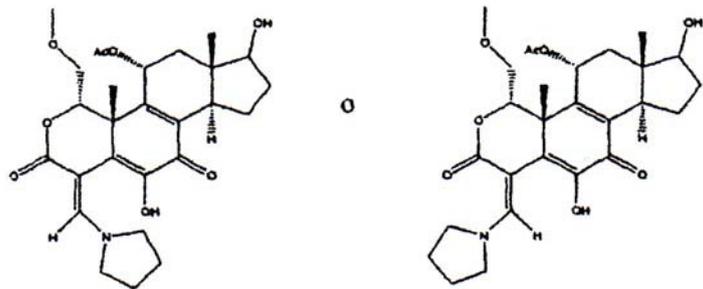
Estructura 4 (wortmanina)



Estructura 5 (17-hidroxiil-wortmanina)

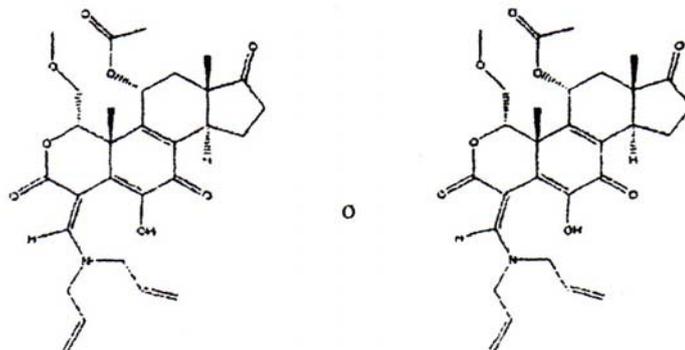


Estrutura 6 (PX-867)

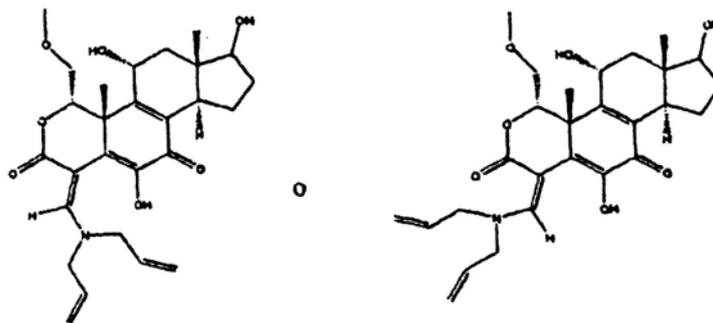


Estrutura 7 (17-hidroxil-PX-867)

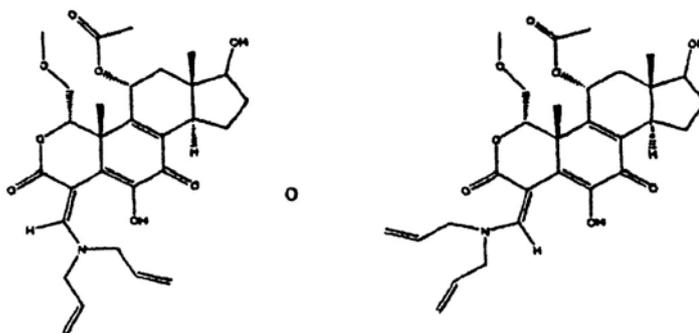
- 5 Los compuestos de la presente divulgación tienen una estructura química correspondiente a un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos representados por las estructuras 9-10, según se muestra en la **FIG. 3**. El Compuesto 8 es comparativo.



Estrutura 8 (PX-866)



Estrutura 9 (11,17-dihidroxil-PX-866; PX-866-1)



Estructura 10 (17-hidroxil-PX-866; PX-866-2)

Los compuestos de la presente divulgación tienen una estructura química representada por las estructuras 9 o 10.

5 Esquemas de síntesis ejemplares para los compuestos comparativos PX-866 (estructura 8 de la FIG. 3) pueden encontrarse en el Ejemplo 1; PX-867 (estructura 6 de la FIG. 2) puede encontrarse en los Ejemplos 2 y 3; 17-hidroxil-wortmanina (estructura 5 en la FIG. 2) y 17-hidroxil-PX-867 (estructura 7 en la FIG. 2) pueden encontrarse en el Ejemplo 3.

10 Según se emplea en la presente memoria, "alquilo" se refiere a radicales hidrocarbonados que tienen de 1 a 20 átomos de carbono, preferiblemente desde 2 hasta 10 átomos de carbono. Puede considerarse que el término "alquilo insaturado" indica que la estructura carbonada contiene dobles o triples enlaces, mientras que "alquilo saturado" se usa para indicar que la estructura carbonada contiene la máxima cantidad posible de hidrógenos: es decir, sin dobles enlaces o, en una cadena hidrocarbonada, cada átomo de carbono está ligado a dos átomos de hidrógeno.

15 El término "alquilo sustituido" comprende grupos alquilo que tienen además uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxil, alcoxi (de un grupo alquilo inferior), mercapto (de un grupo alquilo inferior), cicloalquilo, cicloalquilo sustituido, heterociclo, heterociclo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, ariloxi, ariloxi sustituido, halógeno, trifluorometilo, ciano, nitro, nitrosotiol (-SNO), nitrato (es decir, éster de ácido nítrico), nitrona, nitrito (es decir, éster de ácido nítrico), nitroglicerilo, S-nitrosocisteinilo, S-nitrosoglutacionilo, oxima, N-hidroxilguanidinilo, amino, amido, -C(O)H, acilo, oxiacilo, carboxilo, carbamato, sulfonilo, sulfínilo, sulfonamida, sulfurilo y similares.

20 Según se emplea en la presente memoria, "alquilo cíclico" se refiere a grupos que contienen anillos cíclicos, que contienen en el intervalo de aproximadamente 3 hasta 8 átomos de carbono y "alquilo cíclico sustituido" se refiere a grupos alquilo cíclicos que tienen además uno o más sustituyentes como los indicados anteriormente.

25 La producción biosintética de wortmanina es muy conocida en la especialidad y los análogos se sintetizan a partir de wortmanina. La Patente de EE. UU. N° 5.480.906 describe esquemas sintéticos típicos. En general, la wortmanina se produce mediante la fermentación de uno cualquiera de un número de microorganismos tales como Talaromyces wortmannin, Penicillium wortmannin, Myrothecium roridium y Fusarium. Después de la fermentación, la wortmanina se extrae y se purifica a través de métodos conocidos. Preferiblemente, la wortmanina se sintetiza microbianamente y se aísla en forma sustancialmente pura a partir de un cultivo de fermentación; uno de tales cultivos de fermentación se identifica como A24603.1.

30 Las cepas se cultivan bajo condiciones aeróbicas sumergidas en un medio de cultivo adecuado hasta que se produce una cantidad recuperable de wortmanina. La wortmanina puede recuperarse usando diversos procedimientos de aislamiento y purificación conocidos en la especialidad.

35 El medio usado para hacer crecer el cultivo puede ser uno cualquiera de un número de medios. Sin embargo, por economía de producción, rendimiento óptimo y facilidad de aislamiento del producto, fuentes de carbono preferidas en la fermentación a gran escala son glucosa y almidón soluble tal como almidón de maíz. También pueden usarse maltosa, ribosa, xilosa, fructosa, galactosa, manosa, manitol, dextrina de patata, oleato de metilo, aceites tales como aceite de soja y similares.

40 Fuentes de nitrógeno preferidas son caseína hidrolizada con enzimas, y harina de semillas de algodón, aunque también pueden usarse leche pepsinizada, harina de soja digerida, harina de pescado, licor de impregnación de maíz, extracto de levadura, caseína hidrolizada con ácido, extracto de ternero y similares.

Entre las sales inorgánicas nutrientes que pueden incorporarse en los medios de cultivo están las sales solubles habituales capaces de dar calcio, magnesio, sodio, amonio, cloruro, carbonato, sulfato, nitrato, zinc e iones similares. Elementos traza esenciales necesarios para el crecimiento y el desarrollo del organismo también deben incluirse en el medio de cultivo. Tales elementos traza están presentes comúnmente como impurezas en otros sustituyentes del medio en cantidades suficientes para cumplir los requisitos de crecimiento del organismo.

Para la producción de cantidades sustanciales de wortmanina, se prefiere la fermentación aerobia sumergida en biorreactores agitados. Pequeñas cantidades de wortmanina pueden obtenerse mediante cultivo en matraz removido. Debido al retraso de tiempo en la producción comúnmente asociado con la inoculación de grandes biorreactores con la forma de esporas del organismo, es preferible usar un inóculo vegetativo. El inóculo vegetativo se prepara al inocular un pequeño volumen de medio de cultivo con la forma de esporas o fragmentos miceliales del organismo para obtener un cultivo reciente que crece activamente del organismo. El medio del inóculo vegetativo puede ser el mismo que el usado para fermentaciones mayores, pero también son adecuados otros medios.

Después de su producción, la wortmanina puede recuperarse del medio de fermentación mediante métodos usados en la técnica. La wortmanina producida durante la fermentación del organismo A24603.1, por ejemplo, está presente principalmente en el caldo.

Típicamente, la wortmanina puede recuperarse de la biomasa mediante una variedad de técnicas. Una técnica preferida implica filtrar todo el caldo de fermentación con un filtro cerámico. El filtrado se eluye con un disolvente orgánico tal como acetato de etilo y se concentra. El concentrado se suspende en alcohol hasta que se produce la cristalización y la solución se filtra, se lava y se seca. Para la confirmación, el material cristalino se disuelve en un disolvente orgánico y se cromatografía en un absorbente de gel de sílice en fase inversa (C₈ o C₁₈). Las fracciones se eluyen en un tampón orgánico-acuoso tal como acetonitrilo al 60%.

La wortmanina puede manipularse adicionalmente para llegar a los compuestos de la presente invención. Aunque la síntesis de análogos particulares de wortmanina se ilustra posteriormente, otros esquema sintéticos comunes en la especialidad permitirán a un experto normal en la especialidad sintetizar los compuestos de acuerdo con la presente invención, y los esquemas sintéticos indicados en la presente memoria de ningún modo deben considerarse limitativos.

Para el tratamiento terapéutico de las indicaciones especificadas, las estructuras 9 y 10 que se muestran en la **FIG. 3** pueden administrarse como tales, o pueden combinarse y formularse como composiciones farmacéuticas en forma de dosificación unitaria para la administración parenteral, transdérmica, rectal, nasal, intravenosa local o, preferiblemente, la administración oral. Tales composiciones farmacéuticas se preparan de un modo muy conocido en la especialidad y comprenden al menos un compuesto activo seleccionado de las estructuras 9 y 10 que se muestran en la **FIG. 3**, asociado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "compuesto activo", según se usa a lo largo de esta memoria descriptiva, se refiere a al menos un compuesto seleccionado de las estructuras 4-9 y 10 que se muestran en la **FIG. 3** o sus sales farmacéuticamente aceptables.

Así, una realización de la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del compuesto de estructura 9 o 10, que se muestra en la **FIG. 3**, y uno de sus vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En tal composición, el compuesto activo se conoce como el "ingrediente activo". Al elaborar las composiciones, el ingrediente activo se mezclará habitualmente con un vehículo, o se diluirá mediante un vehículo, o se envolverá con un vehículo que puede estar en la forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el vehículo sirve como un diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido que actúa como un portador, excipiente o medio para el ingrediente activo. Así, la composición puede estar en la forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, bolsitas, cachets, elixires, emulsiones, soluciones, jarabes, suspensiones, cápsulas de gelatina blandas y duras, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

Algunos ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato cálcico, alginatos, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, tragacanto, gelatina, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoatos de metilo y propilo, talco, estearato magnésico, agua y aceite mineral. Las composiciones pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes conservantes, agentes edulcorantes y agentes saborizantes. Las composiciones pueden formularse a fin de proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente al emplear procedimientos muy conocidos en la especialidad.

Para la administración oral, un compuesto puede mezclarse con vehículos y diluyentes, moldearse en comprimidos o envolverse en cápsulas de gelatina. Alternativamente, las mezclas pueden disolverse en líquidos tales como solución acuosa de glucosa al 10%, solución salina isotónica, agua estéril o similares, y administrarse

intravenosamente o mediante inyección.

5 El aporte local de cantidades inhibitorias de un compuesto activo para el tratamiento del cáncer puede ser mediante una variedad de técnicas que administran el compuesto en o cerca de la zona proliferativa. Los ejemplos de técnicas de aporte local no pretenden ser limitativos, sino ser ilustrativos de las técnicas disponibles. Ejemplos incluyen catéteres de aporte local, vehículos específicos para una zona, implantes, inyección directa o aplicaciones directas. El aporte local mediante un catéter permite la administración de un agente farmacéutico directamente a la zona proliferativa.

10 El aporte local mediante un implante describe la colocación quirúrgica de una matriz que contiene el agente farmacéutico en la lesión proliferativa. La matriz implantada libera el agente farmacéutico mediante difusión, reacción química o activadores del disolvente.

Otro ejemplo es el aporte de un agente farmacéutico mediante selladura endoluminal polimérica. Esta técnica usa un catéter para aplicar un implante polimérico a la superficie interior de la luz. El agente farmacéutico incorporado en el implante de polímero biodegradable se libera de ese modo en la zona quirúrgica. Se describe en el documento PCT WO 90/01969 (Schindler, 23 de agosto de 1989).

15 Un ejemplo final de aporte local mediante un implante es mediante inyección directa de vesículas o microparticulados en la zona proliferativa. Estos microparticulados pueden estar compuestos por sustancias tales como proteínas, lípidos, carbohidratos o polímeros sintéticos. Estos microparticulados tienen el agente farmacéutico incorporado en toda la micropartícula o sobre la micropartícula como un revestimiento. Sistemas de aporte que incorporan microparticulados se describen en Lange, Science 249:1527-1533 (1990) y Mathiowitz et ál., J. App. Poly. Sci., 26:809 (1981).

20 El aporte local mediante vehículos específicos para una zona describe ligar el agente farmacéutico a un vehículo que dirigirá el fármaco a la lesión proliferativa. Ejemplos de esta técnica de aporte incluyen el uso de vehículos tales como un ligando de proteína o un anticuerpo monoclonal.

25 El aporte local mediante aplicación directa incluye el uso de aplicaciones tópicas. Un ejemplo de un aporte local mediante aplicación directa es aplicar el agente farmacéutico al tumor arterial o el área que queda después de la resección del tumor.

30 La proliferación de células puede depender de la ruta de señalización de PI-3 quinasa-Akt-mTOR. Además, la señalización a través de PI-3 quinasa y Akt parece inhibir la apoptosis. La capacidad de los análogos de wortmanina y sus metabolitos para inhibir PI-3 quinasa y mTOR puede expresarse como la dosis que provoca 50% de inhibición (IC₅₀). La inhibición del crecimiento de células de cáncer de mama MCF-7 humanas se midió a lo largo de 4 días usando el ensayo de MTT, y los resultados se expresan como la dosis que provoca 50% de inhibición (IC₅₀). El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico estándar para medir la proliferación celular (crecimiento celular). Se usa universalmente para determinar la citotoxicidad de agentes medicinales potenciales y otros materiales tóxicos. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) amarillo se reduce hasta formazano púrpura en la

35 mitocondria de células vivas. Esta reducción tiene lugar solo cuando las enzimas reductasa mitocondriales son activas, y por lo tanto la conversión está directamente relacionada con el número de células viables (vivas). A grupos de 3 ratones C57BL6 se les administró wortmanina en dosis de 1, 2 o 3 mg/kg o los análogos en 1, 3, 9 o 18 mg/kg mediante la ruta intraperitoneal diariamente durante 4 días. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la última dosis y se determinaron los conteos sanguíneos y la química sérica diferenciales. Las principales toxicidades observadas eran toxicidad hepática y linfocitopenia con conteos de glóbulos rojos disminuidos y glucosa sérica incrementada a dosis superiores. Las toxicidades se miden a la dosis tolerada máxima o la dosis más alta probada. La toxicidad hepática se mide como el incremento porcentual medio en ALT y AST séricas expresado con relación a la wortmanina como 1,0. La alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) son enzimas situadas en células hepáticas que se fugan a la circulación general cuando las células hepáticas se lesionan. La

40 linfocitopenia se expresa como la disminución porcentual en los conteos de linfocitos con relación a la wortmanina como 1,0. Una toxicidad hepática baja y una toxicidad para linfocitos alta como un sustituto para la inhibición del crecimiento de células tumorales es la característica deseable.

45 Basándose en los resultados de estos estudios (**Tabla 1**), la wortmanina y los análogos de wortmanina son inhibidores de PI-3 quinasa y se observa que inhiben el crecimiento celular y la supervivencia celular. Por otra parte, estos inhibidores de PI-3 quinasa de wortmanina también inhiben la respuesta inflamatoria local, especialmente en el caso de un implante bioprotésico, lo que puede ser un factor favorable para el injerto a largo plazo u otro implante bioprotésico. En principio, los análogos de wortmanina pueden ser agentes ideales para inducir un bloqueo temporal de la ruta de PI-3 quinasa-Akt-mTOR.

50

Tabla 1: Actividad y toxicidad in vivo para wortmanina y análogos de wortmanina

Compuesto	Dosis tolerada máxima (mg/ml)	Inhibición de PI-3 quinasa IC ₅₀ (nM)	Inhibición de mTOR IC ₅₀ (µM)	Citotoxicidad: grupo de células NCT IC ₅₀ (µM)	Toxicidad de linfocitos relativa a wortmanina	Toxicidad hepática relativa a wortmanina
Wortmanina	2,5	0,3	0,1	8,9	1,0	1,0
PX-86	20	0,5	>3	2,2	2,2	0,3
PX-867	20	1,1	>3	0,5	2,4	0,3

5 También se ha observado en estudios farmacocinéticos como los indicados en la Solicitud de EE. UU. Nº de Serie 11/178.553, titulada "Wortmannin Analogs and Methods and Methods of Using the Same Combination with Chemotherapeutic Agents", presentada el 11 de julio de 2005, que los niveles en sangre de PX-866 y PX-867 después de la administración oral son bajos. Tanto PX-866 como PX-867 pueden ser más eficaces a dosis orales inferiores que cuando se administran intravenosamente. Aunque sin querer limitarse por una teoría, se establece como hipótesis que este efecto es atribuible a metabolitos de PX-866 y PX-867 activos y potencialmente más potentes. Realizaciones de la presente divulgación proporcionan nuevos metabolitos de wortmanina y metabolitos de los análogos de wortmanina y su uso como inhibidores de PI-3 quinasa. Realizaciones adicionales de la divulgación proporcionan el uso de estos nuevos metabolitos como agentes anticancerosos y antitumorales.

15 Se ha observado en la presente memoria que estos metabolitos demuestran actividades inhibitoras contra PI-3 quinazas que pueden ser similares a o inferiores que las de la wortmanina (véase el Ejemplo 7). La capacidad de los metabolitos de análogos de wortmanina para inhibir la activación dependiente del factor de crecimiento epidérmico de Akt se midió en células de cáncer de colon HT-29 mediante hibridación por transferencia western usando anticuerpo anti-fosfo-Ser⁴¹³-Akt (**FIG. 7A**). La cuantificación de las transferencias para dar la relación de fosfo-Ser⁴⁷³-Akt a Akt total se muestra en el **FIG. 7B**. La concentración inhibitora al 50% (IC₅₀) calculada para 17-hidroxi-PX-866 (□) era 40 nM y para 11-desacetilado,17-hidroxi-PX-866 (◆) era mayor de 70 nM. Bajo las mismas condiciones de ensayo, la IC₅₀ para PX-866 precursor era 27 nM (no mostrado). Así, el 17-hidroxi-PX-866 (PX-866-2) tiene la misma actividad inhibitora de fosfo-Ser⁴⁷³-Akt celular que PX-866, mientras que el 11-desacetilado,17-hidroxi-PX-866 (PX-866-1) es mucho menos activo.

25 La citotoxicidad de los metabolitos de análogos de wortmanina se muestra en el **FIG. 8**. Células de cáncer de colon humano HT-29 se hicieron crecer en la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) con suero de ternero fetal al 10% hasta 25% de confluencia, a continuación se hicieron crecer durante 3 días más en medio reciente que contiene (○) PX-866, (□) PX-866-2 (◆) PX-866-1. Los compuestos se añadieron desde una solución de reserva de 10 mg/ml en etanol. El número de células se determinó después de 3 días mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo Guava EasyCyte Plus (Guava Technologies). Los resultados se expresan como el número de células al final del ensayo como porcentaje del valor de control sin fármaco. Los valores son la media de 3 determinaciones y las barras son la desviación estándar. La concentración inhibitora del crecimiento al 50% (IC₅₀) para PX-866 era 4,0 µM, para PX-866-1 era 4,5 µM y para PX-866-2 era mayor de 50 µM. Así, el PX-866-2 tiene la misma actividad inhibitora del crecimiento celular que PX-866 pero PX-866-1 es mucho menos activo.

35 La inhibición de PI-3 quinasa recombinante mediante PX-866 y sus metabolitos se muestra en el **FIG. 9**. La actividad de PI-3 quinasa se midió mediante la fosforilación dependiente de [³²P]γ-ATP de fosfatidilinositol según se describió previamente (Ihle et al. (2005) Mol. Cancer Ther. 4(9): 1349-1357). La **FIG. 9A** muestra resultados del ensayo usando p110α/p85α bovina recombinante (Jena Bioscience, Jena, Alemania) y la **FIG. 9B** muestra resultados del ensayo usando p110β/p85α humana recombinante (Upstate, Charlottesville, VA). La inhibición se midió usando (○) PX-866, (●) wortmanina, (□) PX-866-2 o (◆) PX-866-1. Los resultados muestran que PX-866-2 es tan activo como PX-866 o wortmanina para inhibir las isoformas p110α y p110β de PI-3 quinazas pero el PX-866-1 era considerablemente menos activo.

40 Así, una realización de la divulgación proporciona un compuesto para el uso en la inhibición de la actividad de PI-3 quinasa en mamíferos, en la que se administra una cantidad eficaz de un compuesto de estructura 9 o 10, según se muestran en el **FIG. 3**.

45 Otra realización de la divulgación proporciona un compuesto para el uso en la inhibición de la actividad de PI-3 quinasa en una célula, en la que un compuesto de estructura 9 o 10, según se muestran en el **FIG. 3**, se pone en contacto con la célula, con lo que el compuesto inhibe la PI-3 quinasa.

Puesto que la actividad de PI-3 quinasa puede ser un factor en ciertos tipos de cánceres, la presente divulgación también proporciona el uso de los compuestos como agentes antitumorales, agentes anticancerosos, y composiciones farmacéuticas útiles para el tratamiento de tales tumores o cánceres. Cánceres tratables mediante

- los compuestos de esta divulgación pueden incluir, pero no se limitan a , cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cerebro, cáncer abdominal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer gastrointestinal, glioma, cáncer de hígado, cáncer de lengua, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de próstata, retinoblastoma, tumor de Wilm, mieloma múltiple, cáncer de piel, linfoma y cáncer hemático. Una realización de la divulgación proporciona un compuesto para el uso en el tratamiento del cáncer, en la que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de estructura 9 o 10, según se muestran en la **FIG. 3**. En una realización preferida, el cáncer tratado mediante el compuesto de estructura 9 o 10 es cáncer de colon.
- Realizaciones de la divulgación también proporcionan el uso de una composición farmacéutica para tratar la proliferación de células tumorales o el crecimiento de células tumorales al administrar a un mamífero una composición farmacéutica que contiene un compuesto de estructura 9 o 10, según se muestran en la **FIG. 3**.
- Realizaciones de la divulgación también proporcionan un compuesto para usar en el tratamiento de la proliferación de células tumorales o el crecimiento de células tumorales, en el que se administra una cantidad eficaz de un compuesto de estructura 9 o 10, según se ilustran en la **FIG. 3**.
- En algunos aspectos de la invención, los compuestos de la presente divulgación son derivados denominados profármacos. La expresión “profármaco” indica un derivado de un fármaco de acción directa conocido, derivado que tiene características de aporte y valor terapéutico mejorados en comparación con el fármaco y se transforma en el fármaco activo mediante un proceso enzimático o químico.
- Cuando se produce cualquier variable más de una vez en cualquier constituyente o en cualquiera de los compuestos citados para cualquiera de las fórmulas anteriores, su definición en cada presencia es independiente de su definición en cualquier otra presencia. Además, son permisibles combinaciones de sustituyentes y/o variables solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.
- Se entiende que la presente invención abarca el uso de estereoisómeros, diastereoisómeros e isómeros ópticos de los compuestos de la presente invención, así como sus mezclas. Adicionalmente, se entiende que los estereoisómeros, diastereoisómeros e isómeros ópticos de los compuestos de la presente invención y sus mezclas están dentro del alcance de la invención. A modo de ejemplo no limitativo, la mezcla puede ser un racemato o la mezcla puede comprender proporciones desiguales de un estereoisómero particular sobre el otro. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención pueden proporcionarse como estereoisómeros, diastereoisómeros e isómeros ópticos sustancialmente puros.
- En otro aspecto de la invención, los compuestos pueden proporcionarse en la forma de una sal aceptable (es decir, una sal farmacéuticamente aceptable). Las sales pueden proporcionarse para uso farmacéutico, o como un producto intermedio al preparar la forma farmacéuticamente deseada del compuesto. Por ejemplo, una sal que puede considerarse que es aceptable es la sal por adición de ácido de hidrócloruro. Por ejemplo, el ion cloruro puede estar presente como un ion conjugado para compuestos que tienen cadenas laterales catiónicas. Las sales por adición de ácido de hidrócloruro a menudo son sales aceptables cuando el agente farmacéuticamente activo tiene un grupo amina que puede protonarse.
- Por ejemplo, en algunos aspectos, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto, según se define anteriormente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un compuesto según se define anteriormente.
- Los compuestos de la presente invención pueden administrarse de modo convencional mediante cualquier ruta en la que sean activos. La administración puede ser sistémica, tópica u oral. Por ejemplo, la administración puede ser, pero no se limita a, rutas parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, oral, bucal u ocular, o intravaginalmente, mediante inhalación, mediante inyecciones de depósito, o mediante implantes. Así, los modos de administración para los compuestos de la presente invención (bien solos o bien en combinación con otros productos farmacéuticos) pueden ser, pero no se limitan a, sublingual, inyectable (incluyendo formas de acción corta, depósito, implante y pella inyectadas subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante el uso de cremas vaginales, supositorios, pesarios, anillos vaginales, supositorios rectales, dispositivos intrauterinos y formas transdérmicas tales como parches y cremas.
- Los modos específicos de administración dependerán de la indicación. La selección de la ruta específica de administración y el régimen de dosificación ha de ser ajustada o valorada por el clínico de acuerdo con métodos conocidos por el clínico a fin de obtener la respuesta clínica óptima. La cantidad de compuesto que ha de administrarse es aquella cantidad que es terapéuticamente eficaz. La dosificación que ha de administrarse dependerá de las características del sujeto que se trate, p. ej., el animal particular tratado, la edad, el peso, la salud, los tipos de tratamiento simultáneo, si lo hay, y la frecuencia de los tratamientos, y puede ser fácilmente determinada por un experto en la técnica (p. ej., por el clínico).

Las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos de la presente invención y un vehículo adecuado pueden ser formas de dosificación sólidas que incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, bolsitas, pellas, píldoras, polvos y gránulos; formas de dosificación tópicas que incluyen, pero no se limitan a, soluciones, polvos, emulsiones fluidas, suspensiones fluidas, semisólidos, pomadas, pastas, cremas, geles y gelatinas, y espumas; y formas de dosificación parenterales que incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones, emulsiones y polvo seco; que comprenden una cantidad eficaz de un polímero o copolímero de la presente invención. También se sabe en la especialidad que los ingredientes activos pueden estar contenidos en tales composiciones con diluyentes, cargas, desintegrantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, portadores hidrófobos, portadores solubles en agua, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares farmacéuticamente aceptables. Los medios y los métodos para la administración son conocidos en la especialidad y el especialista puede referirse a diversas referencias farmacológicas como guía. Por ejemplo, pueden consultarse *Modern Pharmaceutics*, Banker & Rhodes, Marcel Dekker, Inc. (1979); y *Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 6ª Edición, MacMillan Publishing Co., Nueva York (1980).

Los compuestos de la presente invención pueden formularse para administración parenteral mediante inyección, p. ej., mediante inyección de bolo o infusión continua. Los compuestos pueden administrarse mediante infusión continua subcutáneamente a lo largo de un período de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. Las composiciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en portadores oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Para la administración oral, los compuestos pueden formularse fácilmente al combinar estos compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la especialidad. Tales vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente que ha de ser tratado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse al añadir un excipiente sólido, triturar opcionalmente la mezcla resultante, y procesar la mezcla de gránulos, después de añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, cargas tales como azúcares, incluyendo, pero no limitados a, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, pero no limitadas a, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes desintegrantes, tales como, pero no limitados a, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una de sus sales tales como alginato sódico.

Los núcleos de gragea pueden proveerse de revestimientos adecuados. Con este propósito, pueden usarse soluciones de azúcar concentradas, que opcionalmente pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Preparaciones farmacéuticas que pueden usarse oralmente incluyen, pero no se limitan a, cápsulas de dos piezas hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes mezclados con una carga tal como, p. ej., lactosa, aglutinantes tales como, p. ej., almidones, y/o lubricantes tales como, p. ej., talco o estearato magnésico y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las composiciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para tal administración.

Para tal administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de, p. ej., comprimidos o pastillas para chupar formulados de modo convencional.

Para la administración mediante inhalación, los compuestos para el uso de acuerdo con la presente invención se aportan convenientemente en la forma de una presentación en espray de aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse al proporcionar una válvula para aportar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de, p. ej., gelatina para el uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Los compuestos de la presente invención también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, p. ej., que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Además de las composiciones descritas previamente, los compuestos de la presente invención también pueden formularse como una preparación de depósito. Tales composiciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular.

5 Las inyecciones de depósito pueden administrarse a intervalos de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 meses o mayores. Así, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

10 En la administración transdérmica, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, pueden aplicarse a un emplasto, o pueden aplicarse mediante sistemas terapéuticos transdérmicos que consiguientemente se aplican al organismo.

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos también pueden comprender soportes o excipientes en fase sólida o de gel adecuados. Ejemplos de tales vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como, p. ej., polietilenglicoles.

15 Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse en combinación con otros ingredientes activos, tales como, por ejemplo, adyuvantes, inhibidores de proteasas u otros fármacos o compuestos compatibles, donde se observa que tal combinación es deseable o ventajosa para alcanzar los efectos deseados de los métodos descritos en la presente memoria.

20 Esta invención y realizaciones que ilustran el método y los materiales usados pueden comprenderse adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

EJEMPLO 1 - COMPARATIVO

25 Este ejemplo ilustra una realización de un método para producir **PX-866**: Éster 4-dialilaminometil-6-hidroxi-1- α -metoximetil-10 β ,13 β -dimetil-3,7,17-trioxo-1,3,4,7,10,11 β ,12,13,14 α ,15,16,17-dodecahidro-2-oxa-ciclopenta[α]fenantren-11-ílico de ácido acético.

30 A una solución de wortmanina (10,7 mg, 25,0 μ mol) en CH_2Cl_2 (125 μ l) se añadió una solución de reserva 0,2 M recientemente preparada de dialilamina (138 μ l, 27,5 μ mol) en CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente y la amina en exceso se retiraron a vacío y el producto se purificó a través de cromatografía sobre SiO_2 (hexanos:acetato de etilo 1:9) para dar **PX-866** (9,0 mg, 17 μ mol, 68%) como un aceite naranja. El producto se analizó mediante varios métodos experimentales y se mostró que era de la estructura correcta y de alta pureza como: $[\alpha_D]$ -630 (c 0,0015, CH_2Cl_2 , 23°C); IR (KBr) 3391, 1743, 1695, 1685, 1622, 1569, 1222, 1111, 1100 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ δ 8,20 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,06 (dd, 1H, J=7,4, 4,8 Hz), 5,85 (s an, 1H), 5,62 (an, 1H), 5,44-5,04 (m, 4H), 4,48 (dd, 1H, J=7,2, 1,9 Hz), 4,05-3,60 (m, 4H), 3,26 (s, 3H), 3,27-3,20 (m, 1H), 3,16 (dd, 1H, J=10,9, 7,2 Hz), 3,00-2,90 (m, 2H), 2,59 (dd, 1H, J=19,4, 8,6 Hz), 2,40 (dd, 1H, J=14,4, 7,7 Hz), 2,35-2,07 (m, 2H), 2,07 (s, 3H), 1,83 (dd, 1H, J=14,4, 4,7 Hz), 1,54 (s, 3H), 0,86 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ δ 217,0, 178,5, 169,6, 164,8, 156,3, 151,5, 139,0, 136,9, 132,2, 131,3, 127,7 (2 C), 119,2, 89,0, 81,9, 73,1, 67,6, 59,1, 50,9 (2 C), 48,9, 42,3, 42,2, 37,5, 36,0, 24,6, 22,2, 20,8, 16,1; MS (EI) m/z (intensidad rel.) 525 (M^+ , 11), 466 (17), 391 (15), 350 (14), 323 (13), 266 (17), 239 (17), 60 (100); HRMS (EI) calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{NO}_8$ 525,2363, encontrado 525,2386.

EJEMPLO 2 - COMPARATIVO

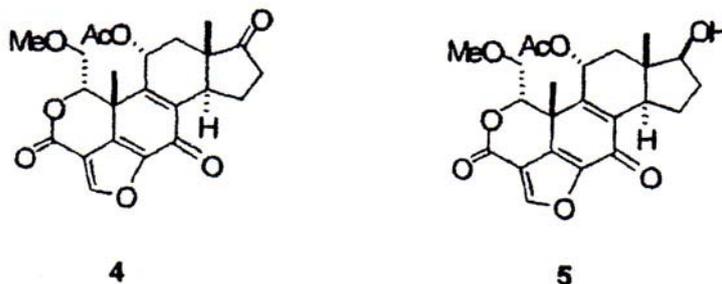
40 Este ejemplo ilustra una realización de un método para producir **PX-867**: Éster 6-hidroxi-1- α -metoximetil-10 β ,13 β -dimetil-3,7,17-trioxo-4-pirrolidin-1-il-metilen-1,3,4,7,10,11 β ,12,13,14 α ,15,16,17-dodecahidro-2-oxa-ciclopenta[α]fenantrenílico de ácido acético.

45 A una solución de wortmanina (30,0 mg, 70,0 μ mol) en CH_2Cl_2 (200 μ l) se añadió pirrolidina (7,0 μ l, 84 μ mol) en CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente y el tiol en exceso se retiraron a vacío y el producto se purificó mediante cromatografía sobre SiO_2 (hexanos/acetato de etilo 9:1, a continuación 1:1) para dar **PX-867** (30,0 mg, 60,6 μ mol, 86%) como un aceite naranja. El producto se analizó mediante varios métodos experimentales y se observó que era de la estructura correcta y de alta pureza como: $[\alpha_D]$ -390 (c 0,0073, CH_2Cl_2 , 23°C); IR (KBr) 3337, 1740, 1684, 1617,1570, 1261, 1221, 1099, 1018 cm^{-1} ; $^1\text{H NMR}$ δ 8,29 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,07 (dd, 1H, J=6,9, 4,8 Hz), 4,47 (dd, 1H, J=7,0, 1,9 Hz), 3,80-3,70 (m, 2H), 3,25 (s, 3H), 3,25-3,14 (m, 2H), 3,02-2,90 (m, 2H), 2,69 (s an, 1H), 2,58 (dd, 1H, J=19,1, 8,4 Hz), 2,39 (dd, 1H, J=14,6, 7,8 Hz), 2,32-2,08 (m, 2H), 2,06 (s, 3H), 1,99-1,95 (m, 5H), 1,84 (dd, 1H, J=14,5, 4,2 Hz), 1,56 (s, 3H), 0,86 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ δ 217,5, 178,9, 169,9, 164,9, 153,9, 151,3, 137,6, 137,1, 129,2, 89,4, 82,1, 73,3, 67,7, 59,3, 55,2, 49,2 (2 C), 42,6,

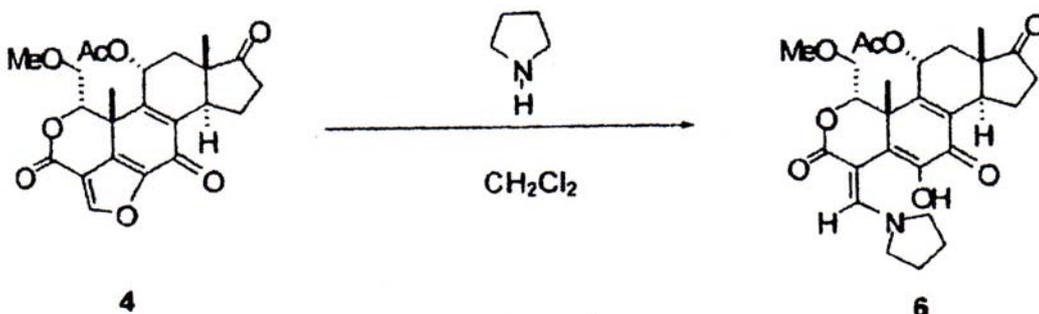
42,4, 37,8, 36,3, 25,6 (2 C), 24,5, 22,4, 21,0, 16,3; **MS** (EI) m/z (intensidad rel.) 499 (M^+ , 1), 439 (2), 365 (7), 167 (35), 149 (100); **HRMS** (EI) calculado para $C_{27}H_{33}NO_8$ 499,2206, encontrado 499,2191.

EJEMPLO 3 - COMPARATIVO

- 5 Este ejemplo ilustra una realización de un método para producir PX-867 y sus metabolitos. La wortmanina (**4**) se obtuvo de Synexa Life Sciences Company para la síntesis de PX-867. El análisis por HPLC de esta wortmanina mostraba una impureza más polar. La cromatografía en capa fina (TLC) de la muestra se desarrolló usando acetato de etilo como el diluyente para visualizar la impureza más polar. La impureza polar se caracterizó usando espectroscopía de NMR de alta resolución y se mostraba que era 17 β -hidroxi-wortmanina (**5** posteriormente).

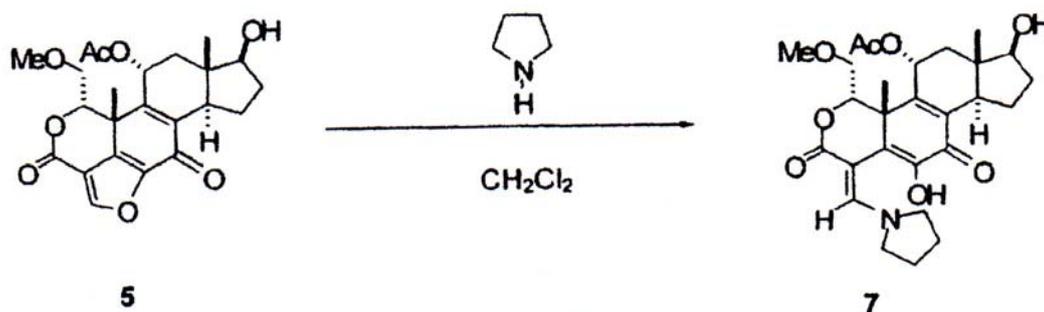


- 10 La wortmanina (**4**) pura obtenida después de la TLC se convirtió en PX-867 (**6**) de acuerdo con el Esquema 1: una solución de pirrolidina en diclorometano se añade a una solución de wortmanina en diclorometano. Se obtuvo PX-867 (**6**) en forma pura y rendimiento muy alto (~95%). Mientras que el PX-867 obtenido a partir de ciertos lotes de wortmanina no requería una purificación adicional, algunos lotes mostraban que todavía quedaban trazas de pirrolidina, incluso después de mantener el compuesto bajo vacío durante la noche. La purificación de PX-867 (**6**) se conseguía mediante cromatografía en columna por gravedad sobre gel de sílice usando acetato de etilo como un eluyente.



esquema 1

- 20 **Síntesis General de PX-867:** A una solución de wortmanina (**4**) (970 mg, 2,26 μ mol) en CH_2Cl_2 (12 μ l) a 0°C se añadió una solución de pirrolidina anhidra (0,2 M, 12 μ l, 2,49 μ mol) en CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. El disolvente y la amina en exceso se retiraron bajo presión reducida y el residuo se cromatografió sobre gel de sílice. La elución con EtOAc daba 1,12 g (2,24 mmol, 99%) de PX-867 como un sólido naranja con rendimiento cuantitativo. El espectro de 1H -NMR del compuesto estaba de acuerdo con los datos espectrales previamente presentados, un ejemplo de los cuales se lista en el Ejemplo 2.
- 25 La impureza más polar caracterizada como 17 β -hidroxi-wortmanina (**5**) (10 mg) se convirtió en **7** mediante un procedimiento similar al descrito anteriormente para PX-867 y según se representa en el **Esquema 2**. El espectro de 1H -NMR está conforme con la estructura of **7** (17 β -hidroxi-PX-867).



esquema 2

EJEMPLO 4 - COMPARATIVO

Este ejemplo ilustra el desarrollo y la validación de un método analítico de HPLC sensible para la determinación cuantitativa de PX-866, a altas concentraciones, en soluciones tamponadoras que han de usarse para estudios de estabilidad. Este método se usó para determinar la estabilidad global de PX-866 en una variedad de sistemas tamponadores usados para la administración de fármacos en estudios preclínicos. El propósito era determinar la estabilidad relativa de PX-866 durante un período de 24 horas para cada una de estas soluciones.

Se usaron técnicas de HPLC con detección UV/Vis para el análisis de las muestras de estabilidad de PX-866. Polvo de PX-866 se disolvió en metanol al 100% hasta una concentración final de 10 mg/ml. Esta solución se usó como una reserva para elaborar las diversas soluciones tamponadoras de prueba que han de analizarse. La reserva, en cada caso, se diluyó 1:10 hasta una concentración de almacenamiento final de 1 mg/ml, con dextrosa al 5% para inyección (DSW), agua estéril para inyección (SW), cloruro sódico al 0,9% para inyección (NS), etanol absoluto (EtOH) y tampón de fosfato sódico (NaH₂PO₄). Antes del análisis, los tampones de prueba se diluyeron adicionalmente 1:100, hasta una concentración analítica final de 10 µg/ml, con ácido fórmico al 0,2%:metanol 50:50 v.v. 50 µl de cada muestra se inyectaron a continuación en el sistema de HPLC (Alliance 2695 Separation Module, Waters, Milford, MA; véase la **Tabla 2** para los parámetros de HPLC) para análisis. Las muestras de prueba de 2 horas y 24 horas se almacenaron, no diluidas, a 4°C antes del análisis, mientras que las muestras de 0 horas se cuantificaron inmediatamente después de la dilución.

Los resultados encontrados en la **FIG. 4** indican la estabilidad diferencial del tampón durante el período de observación de 24 horas. Estos datos demuestran una rápida degradación de PX-866 en dos de las soluciones tamponadoras. En 2 horas, tanto el tampón de fosfato sódico 20 mM (>60% restante) como el DSW (>80% restante) demuestran pérdidas de fármaco inadecuadas. PX-866 era razonablemente estable en NS, SW y EtOH, mostrando <10% de degradación después de 2 horas de almacenamiento. De 2 a 24 horas, el fármaco mantenía una estabilidad relativa, independientemente del sistema tamponador empleado.

Tabla 2: Parámetros de HPLC

LC	Waters 2695 Separation Module (Alliance)
Detector	Waters 2487 Dual Absorbance a 254 nm
Columna analítica	Waters Symmetry C8, 3,5 µm, 4,6 x 150 mm
Fase Móvil	ácido fórmico al 0,2%:metanol 25:75
Caudal	Isocrático; 0,6 ml/min a 134 bar (1950 psi)
Tiempo de Retención	22,4 minutos

Además, se examinó la capacidad de una nueva técnica, UPLC, para cuantificar rápidamente PX-866 en soluciones tamponadoras. Estos sistemas pueden trabajar a contrapresiones de > 1.034 bar (15.000 psi), permitiendo caudales muy altos (> 10 ml/min) con resolución y sensibilidad incrementadas, el uso de volúmenes de muestra mínimos y tiempos de desarrollo analíticos de < 1 minuto. La **FIG. 5** muestra un cromatograma ejemplar para PX-866 en disolventes orgánicos a una concentración de 1 µg/ml. Una inyección de 2 µl (2 ng en la columna) se realizó usando un gradiente de acetonitrilo:agua y una columna C₁₈ en un sistema de UPLC con detección por serie de fotodiodos (Waters Acquity, Milford, MA) dando el perfil cromatográfico representado en la **FIG. 5**. Los datos sugieren que los métodos de UPLC pueden detectar cantidades muy pequeñas de PX-866 y otros análogos de wortmanina y sus metabolitos, y pueden ser útiles en el estudio de la farmacología preclínica de estos compuestos.

EJEMPLO 5

Este ejemplo ilustra la determinación del metabolismo de PX-866 in vitro en microsomas hepáticos de ratón, rata, perro y ser humano y la identificación y el análisis estructural de los metabolitos de PX-866 encontrados en los

mismos.

Se determinó que una longitud de onda de absorbancia UV única para PX-866 estaba entre 300-340 nm (véase la **FIG. 6A**) y esta longitud de onda (310 nm) se usó para la identificación UV de metabolitos de los análogos de wortmanina. El análisis por HPLC de PX-866 mostraba un solo pico que se eluía a los 8,68 minutos (véase la **FIG. 6B**). Fracciones S9 de múrido capaces de soportar reacciones metabólicas de fase I, fase II y fase I/II se mezclaron con 100 nMol de PX-866. Los metabolitos generados en estas reacciones se identificaron mediante desarrollos de HPLC, usando una longitud de onda de 310 nm (véase la **FIG. 6C**). Los picos que representan metabolitos se identificaron al comparar los perfiles de HPLC (a 310 nm) en cromatogramas a partir de tiempos de reacción de 0 min y 60 min. El análisis espectral de masas (MS) correspondiente de estos picos, usando MS de tiempo de vuelo cuádrupolar, permitía que se determinara la masa exacta de los metabolitos (véase la **FIG. 6D**). Se usó el software Metabolyx (Waters-MicroMass, Milford, MA) para interpretar los espectros.

Los experimentos dirigidos a determinar si el metabolismo de Fase II subsiguiente de PX-866 daba como resultado la formación adicional de un glucorónido o productos de sulfatación y los experimentos en Fase I/II combinados producían un patrón de elución de LC y espectros de MS similares a los observados en los experimentos de metabolismo de Fase I solos (datos no mostrados). Estos resultados negativos sugieren que solo se formaban metabolitos tipo Fase I. Se identificó el M N° 1 como un producto de reducción que lo más probablemente es una reducción de carbonilo no microsomal de una cetona en un alcohol secundario, según se describe en estudios de metabolismo previos. Además, M N° 2-3 eran los mismos productos de reducción, sin embargo, la alteración en el tiempo de retención puede indicar que la molécula sufre reducción en zonas distintas a las observadas con el M N° 1. M N° 4 es lo más probablemente un producto de degradación de PX-866. La NMR confirmaba las estructuras de metabolitos de PX-866 de PX-866-1 (M N° 2) y PX-866-2 (M N° 1) que se muestran en la **FIG. 3**.

EJEMPLO 6

Este ejemplo ilustra un método para la determinación de la extensión de unión de proteína plasmática PX-866, in vitro, en plasma de ratón, rata, perro y ser humano usando ultracentrifugación. Se preparó plasma humano, canino, de rata y de ratón al añadir PX-866 para alcanzar las siguientes concentraciones finales: 0 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml y 1000 ng/ml. Se usó una ultracentrífuga Beckman Optima MAX y un rotor TLA 120.2 para centrifugar las muestras a 1.000.000 x g durante 2 horas para separar el plasma en tres capas distintas (proteínica, acuosa y lipoproteínica). Se extrajo PX-866 de cada uno de estos componentes mediante precipitación de proteínas usando una relación 3:1 de metanol enfriado con hielo al volumen de cada capa de componente aislada. La concentración de fármaco dentro de cada componente se comparó a continuación con la concentración en plasma de referencia para determinar el porcentaje de fármaco libre dentro del plasma.

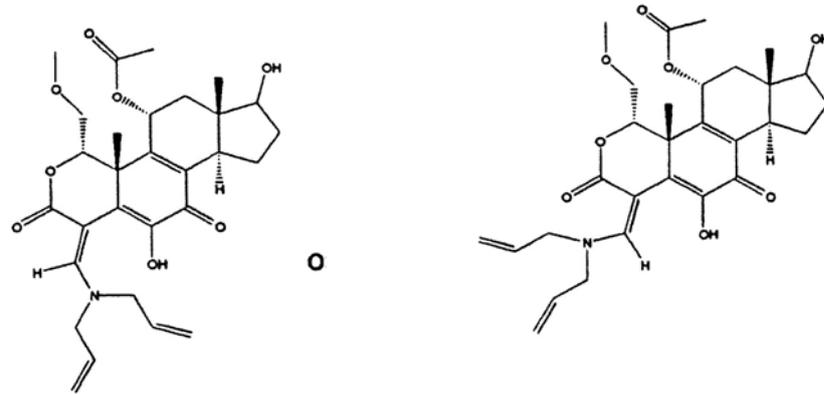
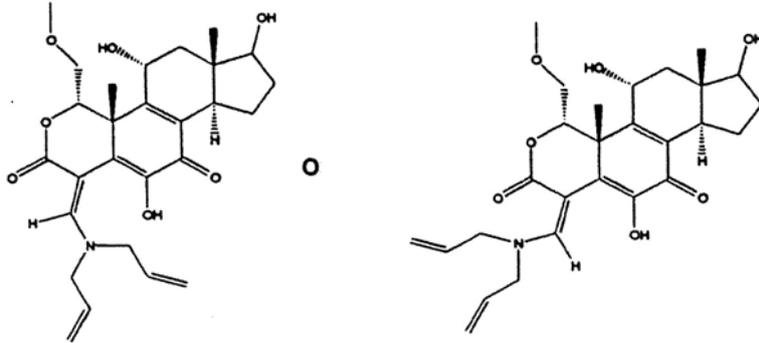
EJEMPLO 7

Este ejemplo ilustra un método para el ensayo de la inhibición de Akt celular en células de cáncer de colon HT-29: células de cáncer de colon humanas HT-29 se expusieron a la modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) sin suero durante 16 horas y a continuación se expusieron en DMEM libre de suero bien a 11-desacetilado,17-hidroxi-PX-866 (PX-866-1) o bien a 17- hidroxi-PX-866 (PX-866-2) a partir de soluciones de reserva de 1 mg/ml en etanol a concentraciones de 10, 25, 50 y 75 nM durante 4 horas. A continuación, las células se estimularon con factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 50 ng/ml durante 20 minutos. Las células se sometieron a lisis y las proteínas se separaron en una SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa. La fosfo-Ser473-Akt y la Akt total se detectaron mediante transferencia western con anticuerpos procedentes de Cell Signaling Technology (Beverly, MA). Una transferencia western ejemplar para los metabolitos del análogo de wortmanina PX-866 se muestra en la **FIG. 7A**. Las transferencias se cuantificaron mediante densitometría y los datos se expresan como la relación de fosfo-Ser473-Akt a Akt total expresados como un porcentaje del valor de control sin fármaco que se muestra en la **FIG. 7B**: (□) PX-866-2 y (◆) PX-866. La concentración inhibidora calculada a 50% (IC₅₀) para PX-866-2 era 40 nM y para PX-866-1 era mayor de 70 nM. Bajo las mismas condiciones de ensayo, la IC₅₀ para PX-866 precursor era 27 nM (no mostrado). Así, PX-866-2 tiene la misma actividad inhibidora de fosfo-Ser473-Akt celular que PX-866, mientras que el PX-866-1 es mucho menos activo.

Aunque la presente invención se ha descrito con detalle considerable con referencia a ciertas de sus realizaciones preferidas, son posibles otras versiones. Por lo tanto, el espíritu y el alcance de las reivindicaciones adjuntas no deben limitarse a la descripción y las versiones preferidas contenidas dentro de esta memoria descriptiva.

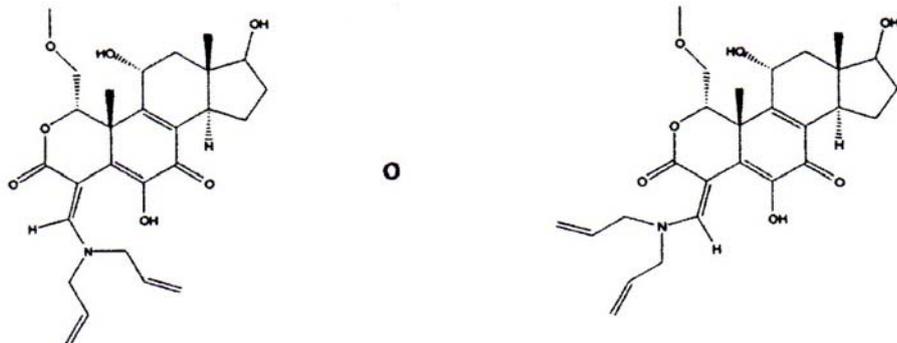
REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto de la fórmula:

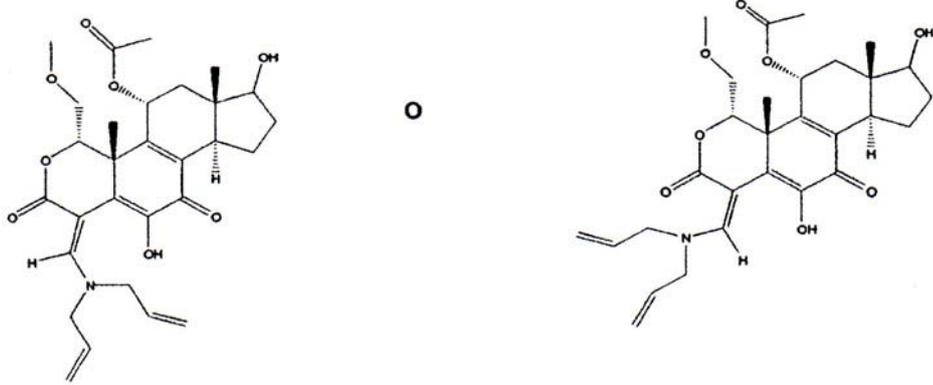


5 y uno de sus vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

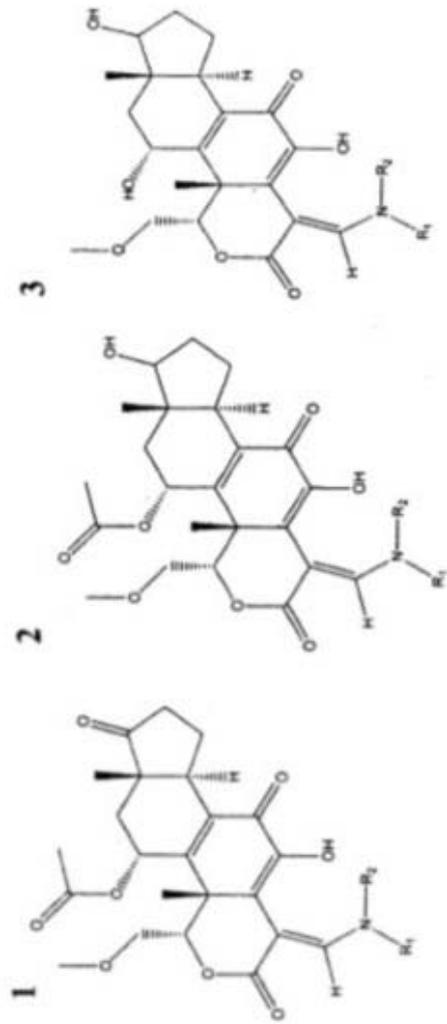
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho compuesto es de la fórmula:



3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho compuesto es de la fórmula



- 4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el uso en el tratamiento del cáncer.
- 5. La composición para el uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el cáncer es cáncer de colon.
- 6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento del cáncer al inhibir la actividad de PI-3 quinasa en mamíferos.
- 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento del cáncer al inhibir la actividad de PI-3 quinasa en una célula.
- 10. 8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, para el uso en el tratamiento de la proliferación de células tumorales o el crecimiento de células tumorales.
- 9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para el uso en el tratamiento del cáncer.
- 10. La composición para el uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el cáncer es cáncer de colon.
- 15. 11. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para el uso en el tratamiento del cáncer al inhibir la actividad de PI-3 quinasa en mamíferos.
- 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para el uso en el tratamiento del cáncer al inhibir la actividad de PI-3 quinasa en una célula.
- 20. 13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, para el uso en el tratamiento de la proliferación de células tumorales o el crecimiento de células tumorales.



Fórmula General -
 en la que R₁ y R₂ son alquilo
 insaturado, alquilo no lineal,
 alquilo ramificado, alquilo
 sustituido o alquilo cíclico.

11,17-dihidroxi

17-hidroxi

Fig. 1

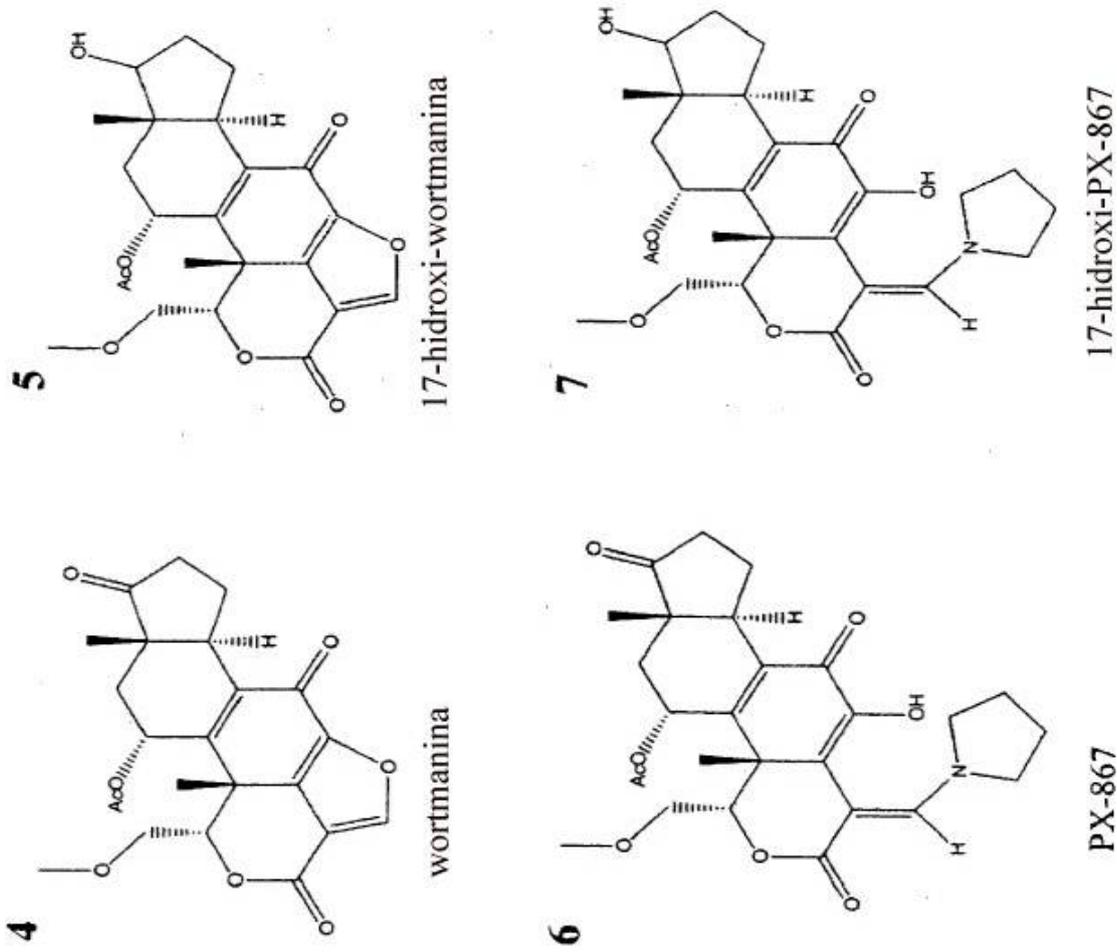


Fig. 2

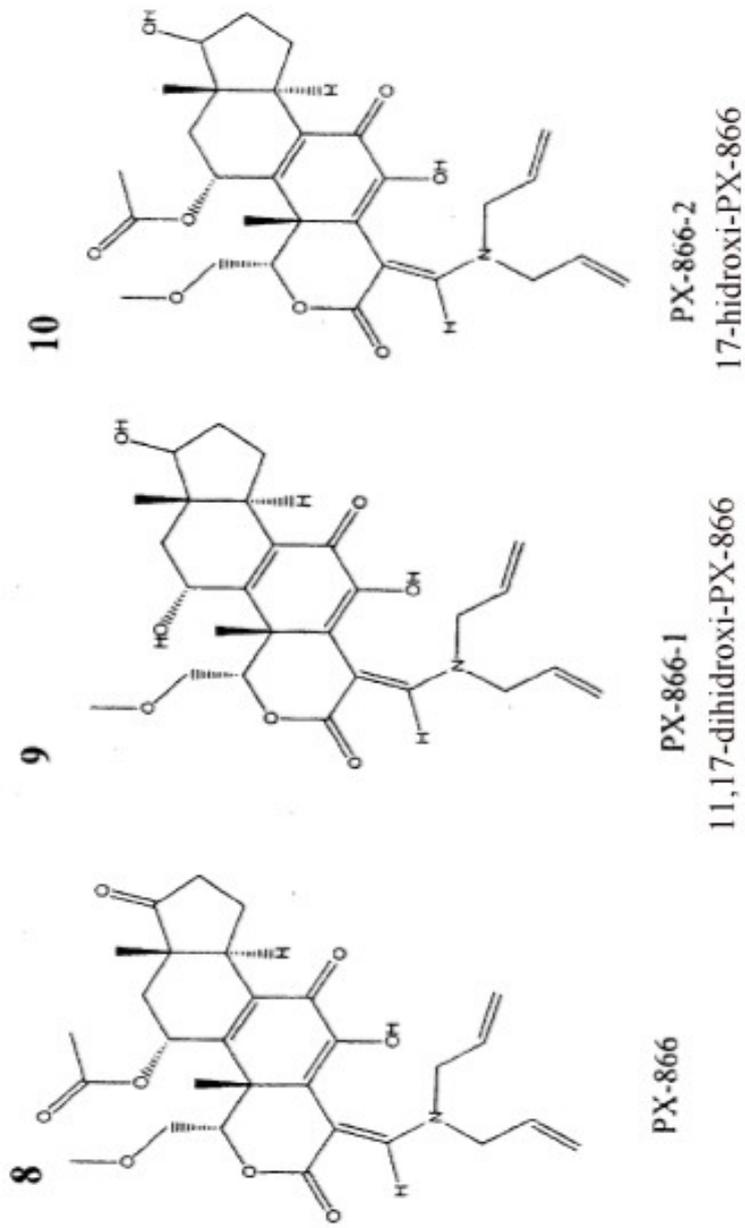


Fig. 3

**Estabilidad de PX-866 en Diversos Tampones
Almacenados a 4°C durante 24 h**

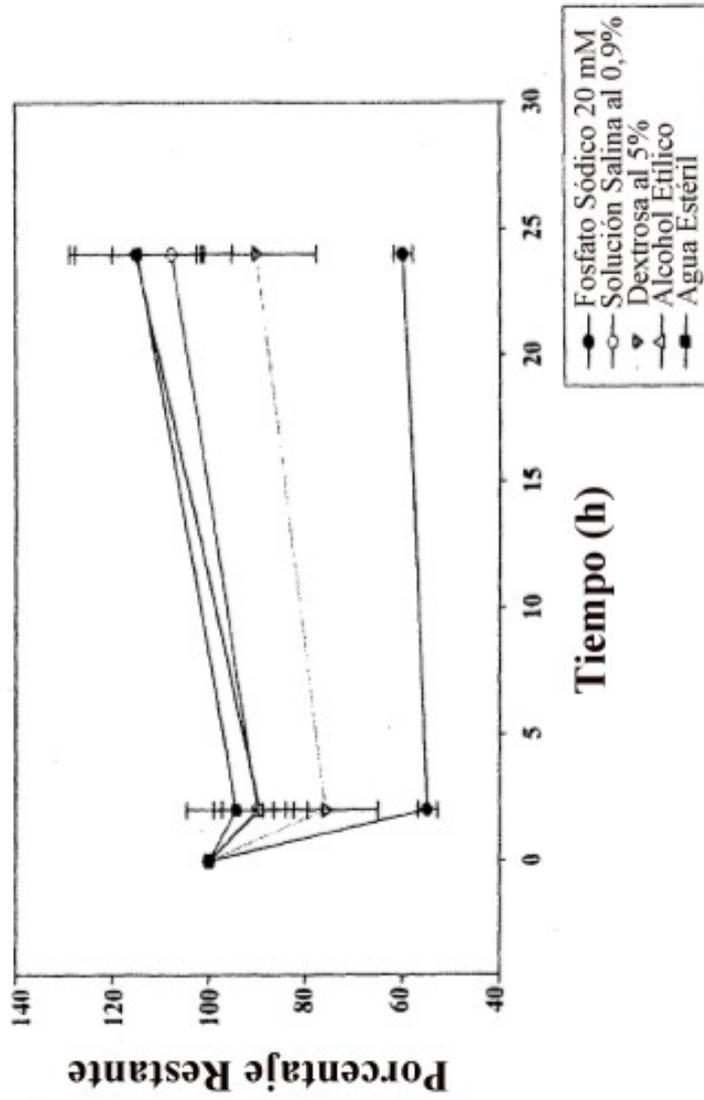


Fig. 4

Cromatograma a Escala Automática

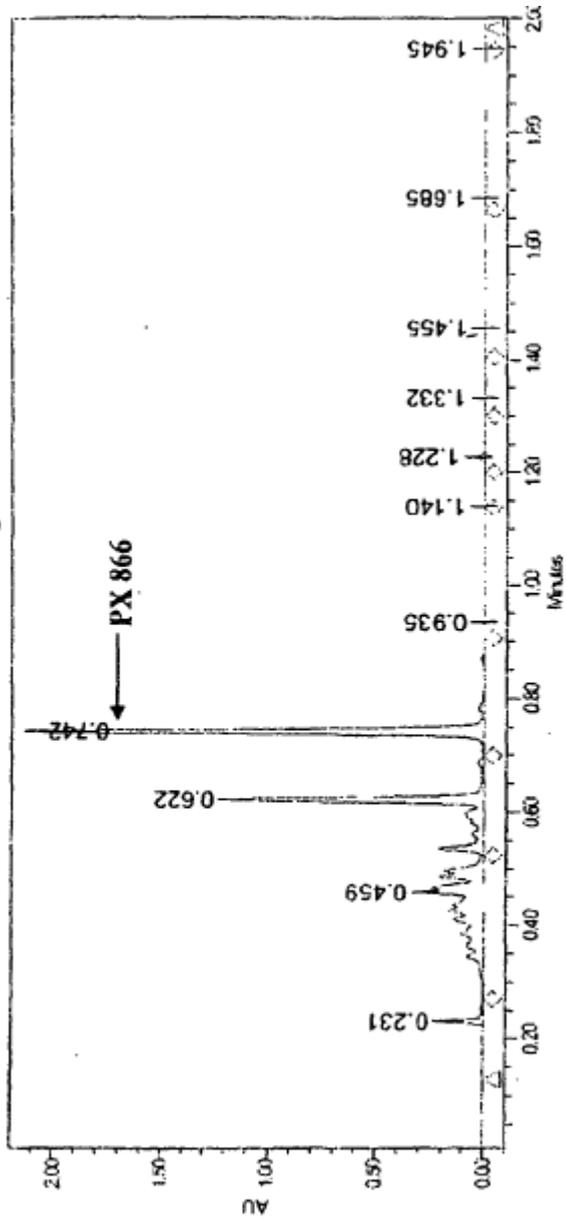


Fig. 5

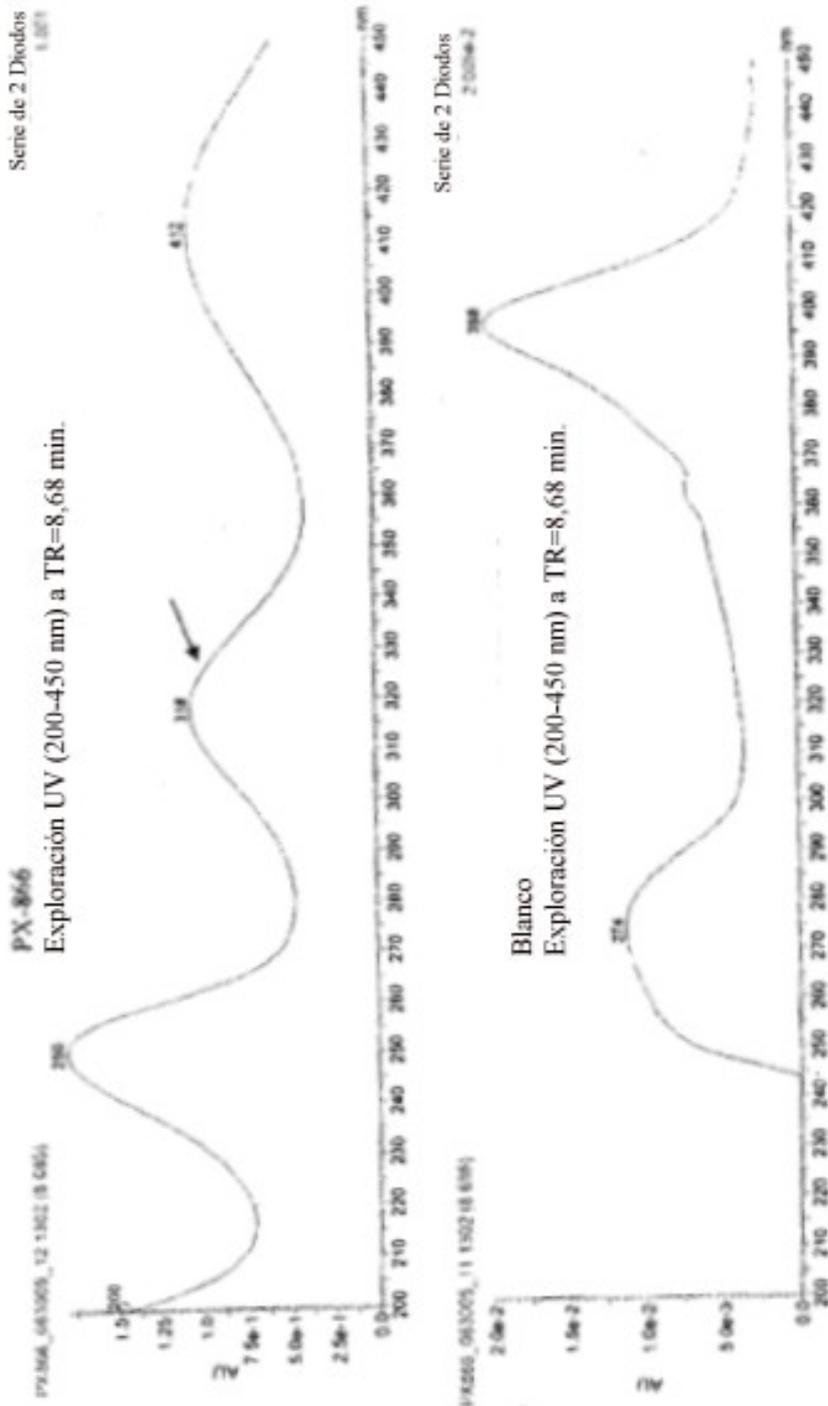


Fig. 6A

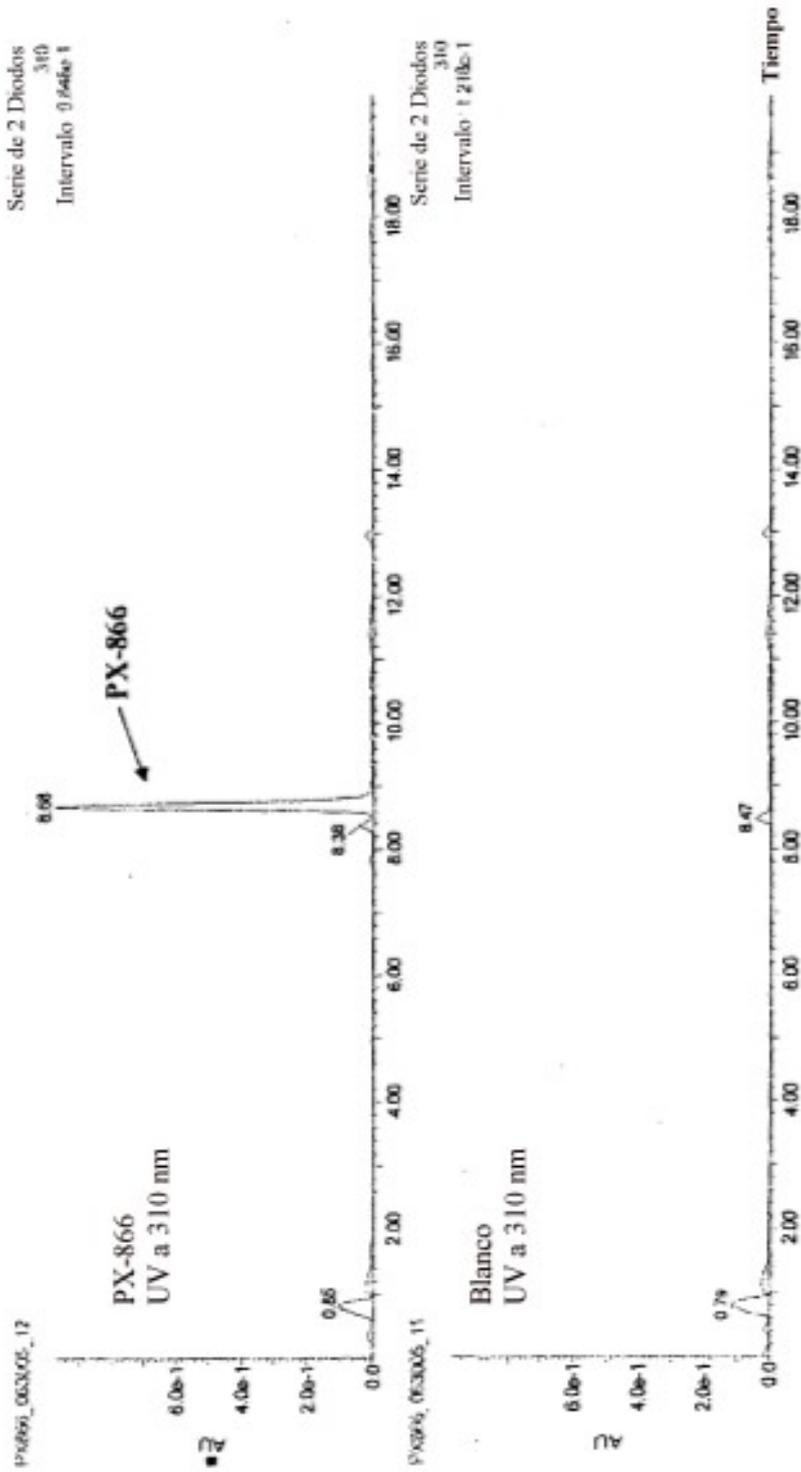


Fig. 6B

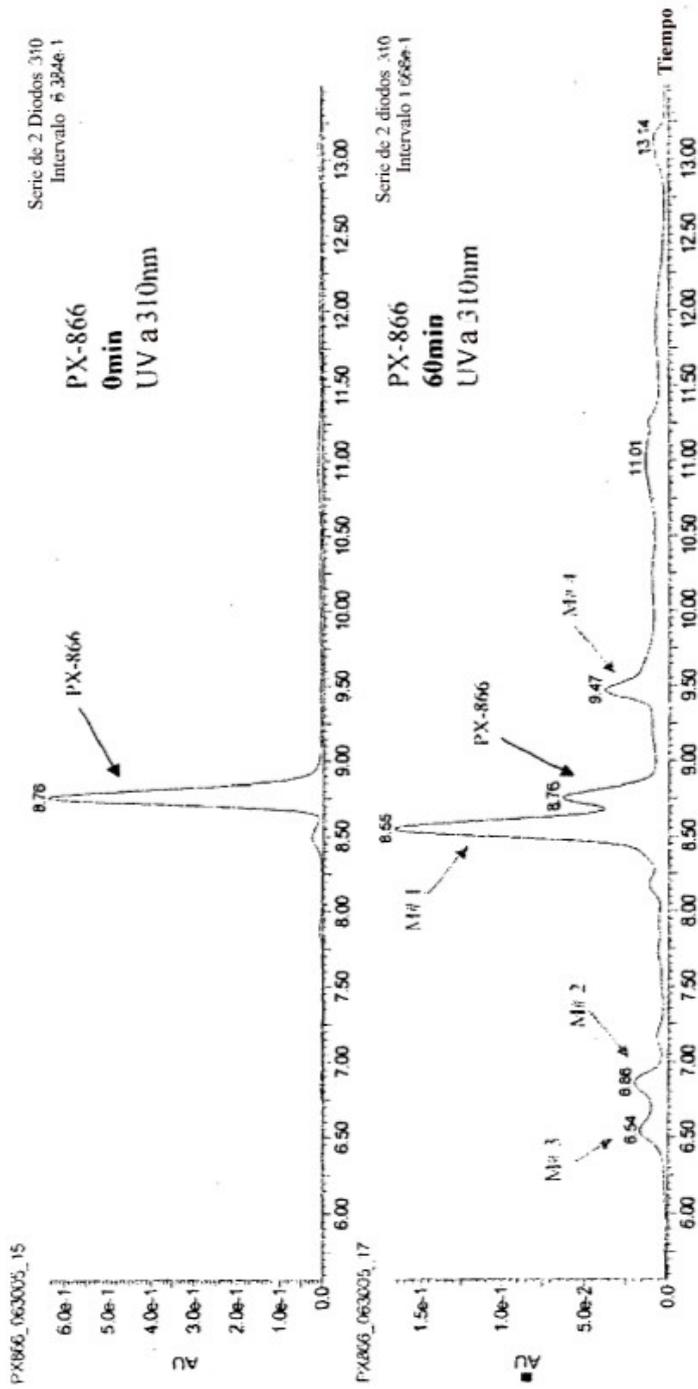


Fig. 6C

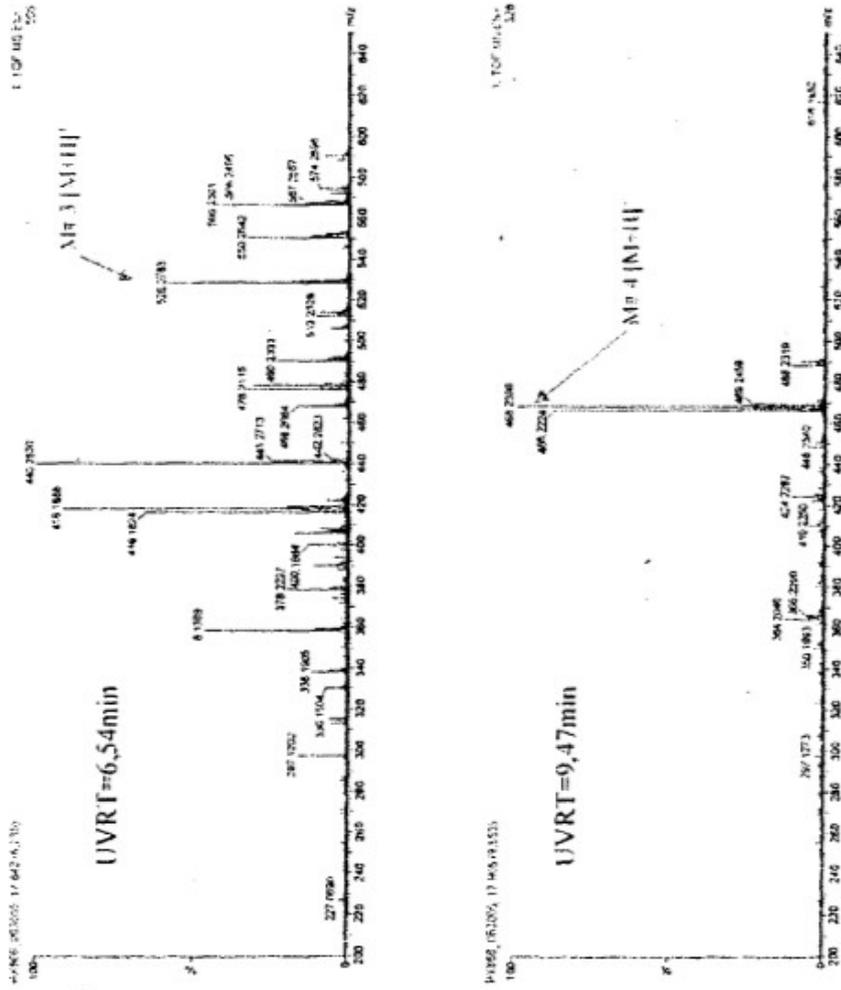


Fig. 6D (continuación)

Inhibición de p-Akt en células de cáncer de colon HT-29 mediante metabolitos de PX-866

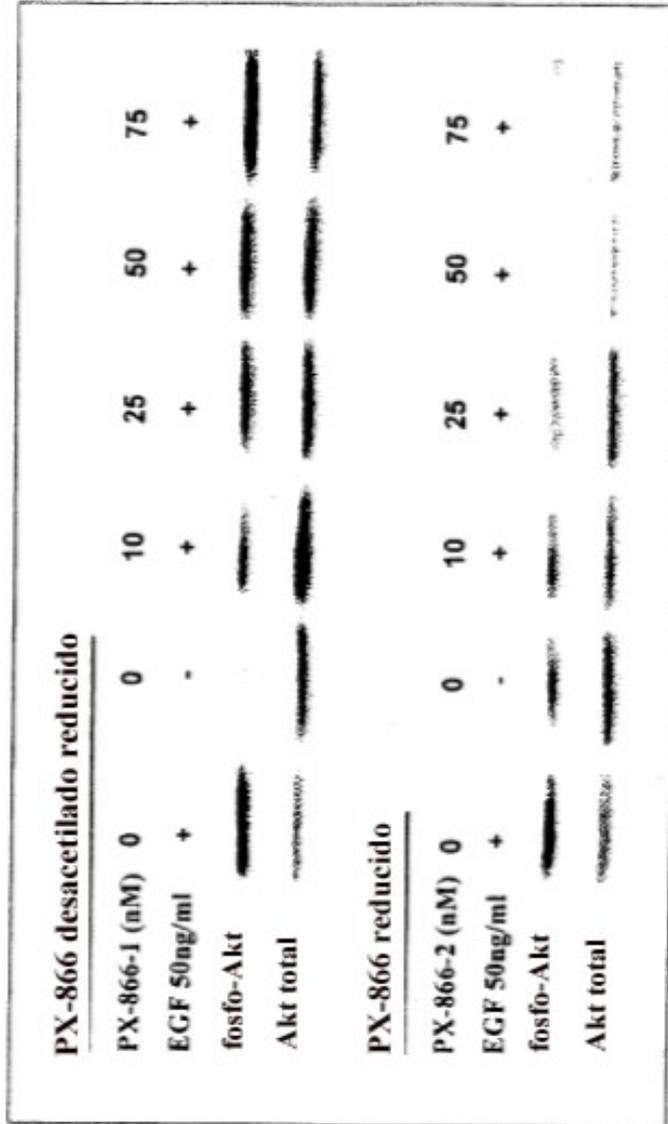


Fig. 7A

Inhibición de p-Akt en células de cáncer de colon HT-29 mediante metabolitos de PX-866

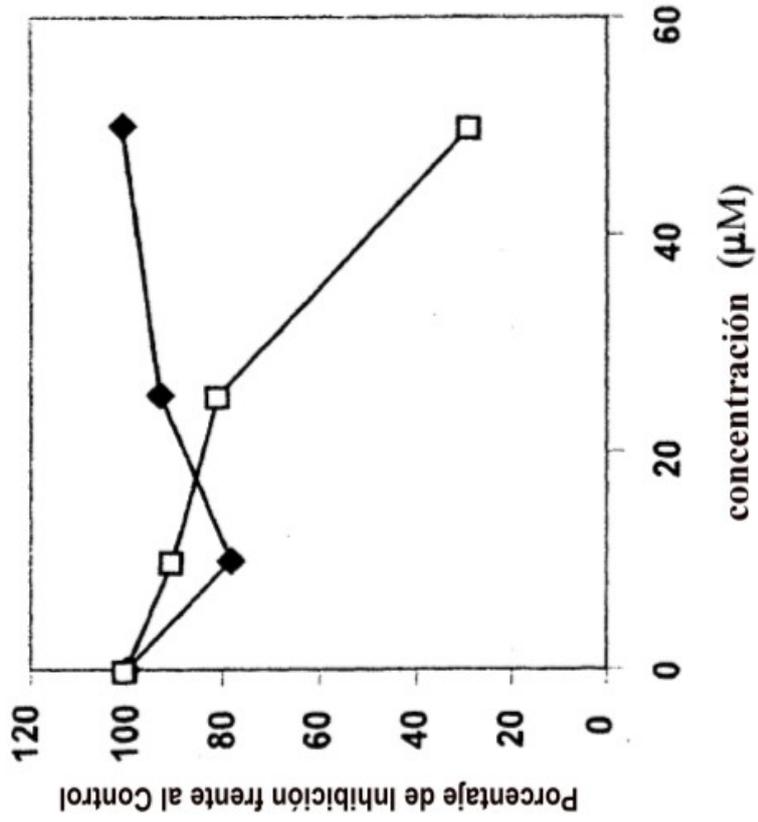


Fig. 7B

Citotoxicidad de metabolitos de PX-866 para células de cáncer de colon HT-29

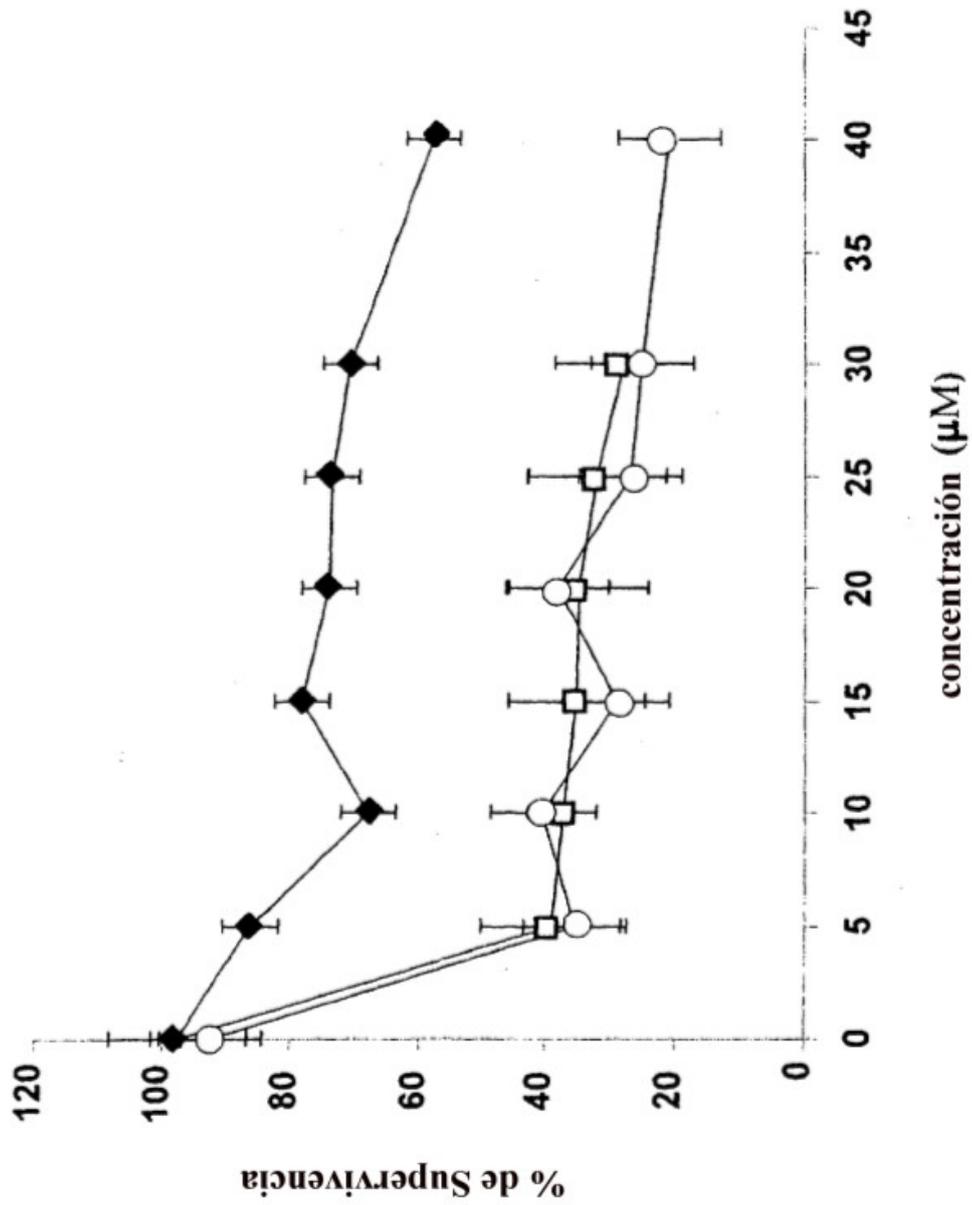


Fig. 8

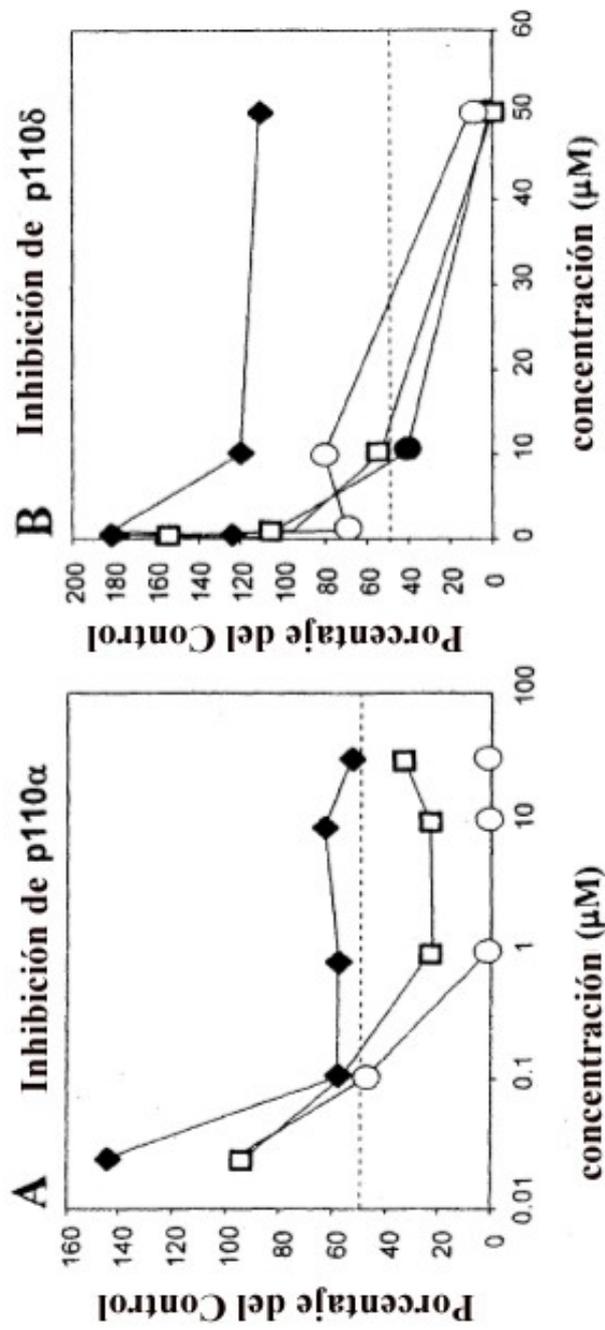


Fig. 9