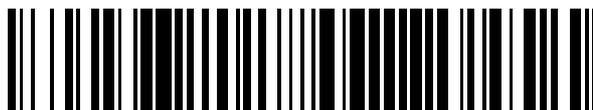


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 817**

51 Int. Cl.:

A61K 31/415 (2006.01)

C07D 231/12 (2006.01)

C07D 301/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08719025 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2134339**

54 Título: **Composiciones que comprenden (S)-2-amino-1-(4-clorofenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol como moduladores de proteínas quinasas**

30 Prioridad:

14.03.2007 GB 0704932

14.03.2007 US 894752 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.10.2014

73 Titular/es:

ASTEX THERAPEUTICS LIMITED (33.3%)

**436 Cambridge Science Park Milton Park
Cambridge Cambridgeshire CB4 0QA, GB;**

**THE INSTITUTE OF CANCER RESEARCH : THE
ROYAL CANCER HOSPITAL (33.3%) y
CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**WOODHEAD, STEVEN JOHN;
REES, DAVID CHARLES;
FREDERICKSON, MARTYN y
GRIMSHAW, KYLA MERRIOM**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 511 817 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

Composiciones que comprenden (S)-2-amino-1-(4-clorofenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol como moduladores de proteínas quinasas

5 La presente invención se refiere a un compuesto de aril-alkilamina que contiene pirazol que inhibe o modula la actividad de la proteína quinasa B (PKB), la proteína quinasa A (PKA), la quinasa ROCK o la quinasa p70S6K, para uso del compuesto en el tratamiento o la profilaxis de patologías o dolencias mediadas por dichas quinasas, y a las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto. Más específicamente, la invención se refiere a un
10 enantiómero individual del 2-amino-1-(4-clorofenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol, a las composiciones farmacéuticas que lo incluyen y a sus usos terapéuticos, así como a los métodos para su preparación y a los novedosos compuestos intermedios del procedimiento.

Antecedente de la invención

15 Las proteínas quinasas constituyen una amplia familia de enzimas estructuralmente relacionadas que son responsables del control de una amplia variedad de procesos de transducción de la señal en el interior de la célula (Hardie, G. y Hanks, S. (1995) The Protein Kinase Facts Book. I y II, Academic Press, San Diego, CA). Las quinasas se pueden clasificar en familias según los sustratos que fosforilan (por ejemplo, proteína tirosina, proteína-serina/treonina, lípidos, etc.). Se han identificado motivos de secuencias que corresponden de una forma
20 general a cada una de estas familias de quinasas (por ejemplo, Hanks, S.K., Hunter, T., FASEB J., 9:576-596 (1995); Knighton, y col., Science, 253:407-414 (1991); Hiles, y col., Cell, 70:419-429 (1992); Kunz, y col., Cell, 73:585-596 (1993); Garcia-Bustos, y col., EMBO J., 13:2352-2361 (1994)).

25 Las proteínas quinasas se pueden caracterizar por sus mecanismos de regulación. Estos mecanismos incluyen, por ejemplo, la autofosforilación, la trasfosforilación por otras quinasas, interacciones proteína-proteína, interacciones proteína-lípido, e interacciones proteína-polinucleótido. Una proteína quinasa individual puede regularse mediante más de un mecanismo.

30 Las quinasas regulan muchos procesos celulares diferentes que incluyen, pero sin limitación, la proliferación, diferenciación, apoptosis motilidad transcripción, traducción y otros procesos de señalización, añadiendo grupos fosfato a las proteínas diana. Estos acontecimientos de fosforilación actúan como interruptores moleculares de activación/desactivación que pueden modular o regular la función biológica de la proteína diana. La fosforilación de las
35 proteínas diana se produce en respuesta a una variedad de señales extracelulares (hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento y diferenciación, etc.), acontecimientos del ciclo celular, estreses ambientales o nutricionales, etc. Las proteínas quinasas adecuadas funcionan en las rutas de señalización para activar o inactivar (tanto de forma directa como indirecta), por ejemplo, una enzima metabólica, proteína reguladora, receptor, proteína citoesquelética, bomba o canal de iones, o factor de transcripción. La señalización descontrolada debida a un defecto en el control de la fosforilación de proteínas se ha implicado en numerosas enfermedades, incluyendo, por ejemplo, inflamación,
40 cáncer, alergia/asma, enfermedades y dolencias del sistema inmune, enfermedades y dolencias del sistema nervioso central, y angiogénesis.

La apoptosis o muerte celular programada es un importante proceso fisiológico que elimina las células que ya no son
45 necesarias en el organismo. El procedimiento es importante en el crecimiento y desarrollo embrionario inicial ya que permite la descomposición controlada no necrótica, la eliminación y la recuperación de componentes celulares. La eliminación de células mediante apoptosis es también importante en el mantenimiento de la integridad cromosómica y genómica de poblaciones celulares en crecimiento. Existen varios puntos de control conocidos en el ciclo de crecimiento celular en los cuales el daño al ADN y la integridad genómica se controlan cuidadosamente. La respuesta a la detección de anomalías en dichos puntos de control es detener el crecimiento de dichas células e iniciar los
50 procedimientos de reparación. Si el daño o las anomalías no se pueden reparar, se inicia entonces la apoptosis de las células dañadas a fin de evitar la propagación de fallos y errores. Las células cancerosas contienen consistentemente numerosas mutaciones, errores o redistribuciones en su ADN cromosómico. Se cree ampliamente que esto se produce en parte debido a que la mayoría de tumores tienen un defecto en uno o más de los procesos responsables del inicio del proceso apoptótico. Los mecanismos de control normales no pueden destruir las células cancerosas y los errores de codificación en los cromosomas o el ADN continúan propagándose. Como consecuencia, restaurar estas señales proapoptóticas o suprimir las señales de supervivencia sin regular es un medio atractivo para tratar el cáncer.
55

PKB

60 La ruta de transducción de la señal que contiene las enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), PDK1 y PKB entre otros, es conocida desde hace por mediar en el aumento de la resistencia a apoptosis o respuestas de supervivencia en muchas células. Existe una sustancial cantidad de datos que indica que esta ruta es una importante ruta de supervivencia utilizada por muchos factores de crecimiento para suprimir la apoptosis. Las enzimas de la familia PI3K se activan por una gama de factores de crecimiento y supervivencia, por ejemplo EGF, PDGF y, mediante la
65 generación de polifosfatidilinositoles, se inicia la activación de los acontecimientos de señalización posteriores que incluyen la actividad de las quinasas PDK1 y de la proteína quinasa B (PKB) conocida también como akt. Esto es

también verdadero en tejidos hospedadores, por ejemplo, tanto en células endoteliales vasculares como en neoplasias. PKB es una proteína ser/thr quinasa que consiste en un dominio quinasa junto con un dominio PH en el extremo N y un dominio regulador en el extremo C. La propia enzima PKB_{alfa} (akt1) se fosforila en Thr 308 por PDK1 y en Ser 473 por 'PDK2', se cree ahora que está constituida a partir de la diana de rapamicina quinasa (TOR) y se asocia a la proteína rictor. La activación completa requiere la fosforilación en ambos sitios a la vez que se requiere la asociación entre PIP3 y el dominio PH para anclar la enzima a la cara citoplásmica de la membrana lipídica proporcionando un acceso óptimo a los sustratos.

Se han sugerido al menos 10 quinastas que funcionan como una quinasa para Ser 473 incluyendo la proteína quinasa-2 (MK2) (una proteína quinasa activada por mitógeno (MAP)), quinasa unida a integrina (ILK), quinasa MAP p38, proteína cinasa Calfa (PKCalfa), PKCbeta, la quinasa-6 relacionada con NIMA (NEK6), la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), la proteína quinasa dependiente de ADN bicatenario (DNK-PK), y el producto génico mutado debido a ataxia telangiectasia (ATM). Los datos disponibles sugieren que se pueden usar sistemas múltiples en células para regular la activación de PKB. La activación completa de PKB requiere la fosforilación en ambos sitios a la vez que se requiere la asociación entre PIP3 y el dominio PH para anclar la enzima a la cara citoplásmica de la membrana lipídica proporcionando un acceso óptimo a los sustratos. Se han notificado recientemente mutaciones del dominio PH. Los autores proporcionan una evidencia directa de la implicación de AKT1 en el cáncer humano por medio de estudios estructurales, bioquímicos y biológicos y demuestran el potencial oncogénico de la mutación E17K de Akt 1. Se identificó la mutación en 5 de 61 cánceres de mama (8%), 3 de 51 (6%) cánceres colorrectales y 1 de 50 cánceres de ovario (2%) (Nature 448, 439-444 (26 de julio de 2007) | doi:10.1038/nature05933; Recibido el 8 de marzo de 2007: Aceptado el 11 de mayo de 2007: Publicado en línea el 4 de julio de 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer)

Recientemente, se ha notificado que las mutaciones somáticas de la subunidad catalítica de PIK3, PIK3CA, son habituales (25-40%) entre los cánceres colorrectales, gástrico, mama, de ovario, tumores cerebrales de grado alto. Las mutaciones en PIK3CA son acontecimientos habituales que se pueden producir inicialmente en la carcinogénesis de vejiga. En carcinomas de mama invasivos, las alteraciones de PIK3CA están principalmente presentes en tumores lobulares y ductales. La ruta PI3K se activa extensamente en carcinomas endometriales, y la combinación de alteraciones PIK3CA/PTEN puede jugar un importante papel en el desarrollo de estos tumores. Los tumores activados por mutaciones de la PI3 quinasa y la pérdida de PTEN tendrán una activación sostenida de PKB y como resultado serán desproporcionadamente sensibles a la inhibición por inhibidores de PKA/PKB.

PKB activado fosforila a su vez una gama de sustratos que contribuyen a la respuesta de supervivencia global. Aunque los inventores no están seguros de entender todos los factores responsables de la mediación en la respuesta de supervivencia dependiente de PKB, se cree que algunas acciones importantes son la fosforilación y la inactivación del factor proapoptótico BAD y de la caspasa 9, la fosforilación de los factores de transcripción Forkhead, por ejemplo, FKHR conducen a su exclusión del núcleo, y a la activación de la ruta NfκB mediante fosforilación de las quinastas anteriores en la cascada.

Además de las acciones antiapoptóticas y prosupervivencia de la ruta PKB, la enzima juega también un importante papel en la promoción de la proliferación celular. Esta acción va a estar de nuevo probablemente mediada por algunas acciones, algunas de las cuales se piensa que son la fosforilación y la inactivación del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina de p21^{CIP1/WAF1}, y la fosforilación y la activación de mTOR, una quinasa que controla algunos aspectos del tamaño, crecimiento y traducción de proteínas en la célula.

La fosfatasa PTEN que desfosforila e inactiva los polifosfatidilinositoles es una proteína supresora tumoral clave que actúa normalmente para regular la ruta de supervivencia de PI3K/PKB. Se puede considerar la importancia de la ruta PI3K/PKB en la tumorigénesis a partir de la observación de que PTEN es una de las dianas de mutación más habituales en tumores humanos, habiéndose encontrado mutaciones de esta fosfatasa en un 50% o más de melanomas (Guldberg y col 1997, Cancer Research 57, 3660-3663) y cánceres de próstata avanzados (Cairns y col 1997 Cancer Research 57, 4997). Estas y otras observaciones sugieren que una amplia variedad de tipos tumorales son dependientes de la actividad potenciada de PKB para el crecimiento y supervivencia y responderían terapéuticamente a inhibidores adecuados de PKB.

Existen 3 isoformas estrechamente relacionadas de PKB denominadas alfa, beta y gamma (AKT1,2 y 3), cuyos estudios genéticos sugieren tener funciones distintas pero solapantes. La evidencia sugiere que pueden todas tener papeles independientes en el cáncer. Por ejemplo, se ha descubierto que PKB beta se expresa en exceso o se activa en un 10 - 40% de cánceres de ovario y pancreáticos (Bellacosa y col, 1995, Int. J. Cancer 64, 280 - 285; Cheng y col 1996, PNAS 93, 3636-3641; Yuan y col 2000, Oncogene 19, 2324-2330), PKB alfa está amplificado en cáncer gástrico, de próstata y de mama humano (Staal 1987, PNAS 84, 5034 - 5037; Sun y col 2001, Am. J. Pathol. 159, 431 -437) y se ha observado una actividad gamma de PKB aumentada en líneas celulares de mama y de próstata independientes de esteroides (Nakatani y col 1999, J. Biol. Chem. 274, 21528 - 21532).

La ruta PKB funciona también en el crecimiento y la supervivencia de tejidos normales y puede regularse durante la fisiología normal para controlar la función celular y tisular. De esta manera los trastornos asociados con la proliferación y supervivencia indeseables de células y tejidos normales pueden beneficiarse también terapéuticamente del

tratamiento con un inhibidor de PKB. Los ejemplos de dichos trastornos son los trastornos de las células inmunes asociados con la expansión y supervivencia prolongada de población celular que conduce a una respuesta inmune prolongada o regulada en exceso. Por ejemplo, la respuesta de los linfocitos T y B a antígenos o factores de crecimiento análogos tales como el interferón gamma activa la ruta PI3K/PKB y es responsable de mantener la supervivencia de los clones de linfocitos específicos de antígenos durante la respuesta inmune. En condiciones en las que los linfocitos y otras células inmunes están respondiendo a antígenos propios o extraños inadecuados, o en el que otras anomalías conducen a una activación prolongada, la ruta PKB contribuye a que una importante señal de supervivencia evite los mecanismos normales en los que se finaliza la respuesta inmune mediante la apoptosis de la población celular activada. Existe una considerable cantidad de evidencias que demuestran la expansión de las poblaciones de linfocitos que responden a antígenos propios en condiciones autoinmunes tales como la esclerosis múltiple y la artritis. La expansión de poblaciones de linfocitos que responden de manera inadecuada a antígenos extraños es una característica de otro conjunto de dolencias tales como respuestas alérgicas y asma. En resumen, la inhibición de PKB proporcionaría un tratamiento beneficioso de los trastornos inmunes.

Otros ejemplos de una expansión inadecuada, crecimiento, proliferación, hiperplasia y supervivencia de células normales en las que PKB puede jugar un papel incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis, miopatía cardíaca y glomerulonefritis.

Además del papel en el crecimiento y la supervivencia celular, la ruta de PKB funciona en el control del metabolismo de la glucosa mediante la insulina. La evidencia disponible procedente de ratones deficientes en las isoformas alfa y beta de PKB sugiere que esta acción está mediada por la isoforma beta principalmente. En consecuencia, los moduladores de la actividad de PKB pueden encontrar también utilidad en enfermedades en las que existe una disfunción del metabolismo de la glucosa y el almacenamiento de energía tales como la diabetes, la enfermedad metabólica y la obesidad.

PKA

La proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) es una proteína serina/treonina quinasa que fosforila una amplia gama de sustratos y está implicada en la regulación de muchos procesos celulares que incluyen el crecimiento celular, la diferenciación celular, la conductividad del canal de iones, la transcripción génica y la liberación sináptica de neurotransmisores. En su forma inactiva, la holoenzima PKA es un tetrámero que comprende dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas.

PKA actúa como enlace entre acontecimientos de transducción de la señal mediados por la proteína G y los procesos celulares que regulan. La unión de un ligando de hormona tal como glucagón a un receptor transmembrana activa una proteína G acoplada a receptor (unión de GTP y proteína hidrolizante). Tras su activación, la subunidad alfa de la proteína G se disocia y se une a y activa la adenilato ciclasa, que a su vez convierte el ATP en AMP cíclico (AMPC). El AMPC producido de esta manera se une a continuación a las subunidades reguladoras de PKA que conducen a la disociación de las subunidades catalíticas asociadas. Las subunidades catalíticas de PKA, que están inactivas cuando se asocian con las subunidades reguladoras, se vuelven activas tras la disociación y participan en la fosforilación de otras proteínas reguladoras.

Por ejemplo, la subunidad catalítica de PKA fosforila la quinasa Fosforilasa quinasa que está implicada en la fosforilación de la fosforilasa, que es la enzima responsable de romper el glicógeno para liberar la glucosa. PKA está también implicada en la regulación de los niveles de glucosa fosforilando y desactivando la glicógeno sintasa. Por tanto, los moduladores de la actividad de PKA (cuyos moduladores pueden aumentar o disminuir la actividad de PKA) pueden ser útiles en el tratamiento o la gestión de enfermedades en las que existe una disfunción del metabolismo de la glucosa y el almacenamiento de energía tales como la diabetes, la enfermedad metabólica y la obesidad.

PKA se ha establecido también como un inhibidor fundamental de la activación de linfocitos T. Anndahl *et al.*, han investigado el posible papel de PKA de tipo I en la disfunción de los linfocitos T inducida por VIH sobre la base de que los linfocitos T procedentes de pacientes infectados con VIH tienen niveles aumentados de AMPC y son más sensibles a la inhibición por análogos de AMPC que los linfocitos T normales. A partir de sus estudios, concluyeron que la activación aumentada de PKA de tipo I puede contribuir a la disfunción progresiva de los linfocitos T en la infección por VIH y que PKA de tipo I puede ser por tanto una diana potencial para el tratamiento de inmunomodulación. -Aandahl, E. M., Aukrust, P., Skalhegg, B. S., Muller, F., Frøland, S. S., Hansson, V., Tasken, K. Protein kinase A type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients. *FASEB J.* 12, 855-862 (1998).

Se ha reconocido también que las mutaciones en la subunidad reguladora de PKA pueden conducir a la hiperactivación en el tejido endocrino.

Debido a la diversidad y a la importancia de PKA como mensajero en la regulación celular, las respuestas anómalas de AMPC pueden conducir a una variedad de enfermedades humanas derivadas de esto, tales como un crecimiento celular y una proliferación irregulares (Stratakis, C.A.; Cho-Chung, Y.S.; Protein Kinase A and human diseases. *Trends Endocrin. Metab.* 2002, 13, 50-52). Se ha observado la expresión en exceso de PKA en una variedad de células cancerosas humanas que incluyen las derivadas de pacientes con cáncer de ovario, mama y colon. La inhibición de

PKA podría por tanto ser una solución para el tratamiento del cáncer (Li, Q.; Zhu, G-D.; Current Topics in Medicinal Chemistry, 2002, 2, 939-971).

5 Para una revisión del papel de PKA en la enfermedad humana, véase por ejemplo, Protein Kinase A and Human Disease, Editado por Constantine A. Stratakis, Annals of the New York Academy of Sciences, Volumen 968, 2002, ISBN 1-57331-412-9.

Quinasas ROCK

10 La familia de quinasas ROCK comprende dos miembros conocidos: ROCK1 y ROCK2:

ROCK1. Sinónimos: proteína quinasa 1 asociada a Rho: p160 ROCK; P160 ROK; p160 ROCK-1, proteína quinasa 1 que contiene espiras enrolladas asociada a Rho; quinasa 1 de Rho; ROK beta.

15 **ROCK2.** Sinónimos: proteína quinasa 2 asociada a Rho: p164 ROCK; p164 ROK; p164 ROCK-2; proteína quinasa 2 que contiene espiras enrolladas asociada a Rho; quinasa 2 de Rho; ROK alpha.

20 Los procesos de metástasis implican una restructuración del citoesqueleto así como adhesiones célula-célula y célula-matriz que permiten a las células desprenderse de la masa tumoral, invadir el tejido local, y en última instancia diseminarse a través del cuerpo. Estos efectos sobre la morfología y la adhesión celular están regulados por miembros de la familia Rho GTPasa

25 RhoA activado puede interactuar con algunas proteínas efectoras incluyendo las quinasas ROCK, ROCK1 y ROCK2. ROCK1 y ROCK2 puede activarse por el complejo RhoA-GTP mediante asociación física. Los ROCK activados fosforilan numerosos sustratos y juegan importantes papeles en las funciones celulares fundamentales. Los sustratos de ROCK incluyen la subunidad de unión a miosina y la cadena ligera de la fosfatasa de la miosina (MBS, denominada también MYPT1), adducina, moesina, la cadena ligera de la miosina (MLC), la quinasa LIM, y el factor de transcripción FHL. La fosforilación de estos sustratos modula la actividad biológica de las proteínas y proporciona un medio para alterar la respuesta de la célula a estímulos externos.

30 Se observa comúnmente en cánceres humanos la expresión elevada de RhoA y RhoC, así como de las proteínas efectoras de Rho, ROCK1 y ROCK2, que incluyen en progresión de tumores de células germinales testiculares, pequeños carcinomas de mama con capacidad metastásica, invasión y metástasis de cáncer de vejiga, progresión del tumor en carcinoma de ovario.

35 La progresión de tumores a formas invasivas y metastásicas requiere que las células tumorales experimenten cambios morfológicos drásticos, un proceso regulado por las Rho GTPasas. La contractilidad de la actomiosina es un mecanismo por el cual las células ejercen fuerza locomotriz frente a su entorno. La señalización posterior de la GTPasa Rho pequeña aumenta la contractilidad a través de la regulación mediada por ROCK de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina-II (MLC2).

40 Se piensa que las quinasas ROCK participan en la inducción de adhesiones locales y fibras de tensión y median en la sensibilización del calcio de la contracción del músculo liso potenciando la fosforilación de la cadena ligera reguladora de la miosina.

45 Los estudios *in vivo* han mostrado que la inhibición de ROCK redujo la invasividad de algunas líneas celulares tumorales. Los inhibidores de ROCK, tales como Y-27632 o WF-536, se han usado en algunos estudios para demostrar estas propiedades.

50 Se ha sugerido los inhibidores de ROCK para uso en los tratamientos de una variedad de enfermedades. Estas incluyen enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión, insuficiencia cardíaca crónica y, congestiva, hipertrofia cardíaca; restenosis, insuficiencia renal crónica y aterosclerosis. Asimismo, debido a sus propiedades de relajación muscular, los inhibidores pueden ser también adecuados para el asma, la disfunción eréctil en varones, la disfunción sexual en mujeres y el síndrome I de vejiga hiperactiva.

55 Se ha mostrado que los inhibidores de ROCK poseen propiedades antiinflamatorias. de esta manera se pueden usar como tratamiento de enfermedades neuroinflamatorias tales como ictus, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y dolor inflamatorio, así como otras enfermedades inflamatorias tales como la artritis reumatoide, síndrome de intestino irritable, y enfermedad inflamatoria del intestino. Basándose en sus efectos inductores sobre la extensión del recrecimiento de neuritas, los inhibidores de ROCK podrían ser fármacos útiles para la regeneración neuronal, induciendo el crecimiento de axones nuevas y el recableado de los axones a través de las lesiones del SNC. De esta forma, los inhibidores de ROCK son útiles para el tratamiento regenerativo de los trastornos del SNC tales como lesiones de la médula espinal, lesión neuronal aguda (ictus, lesión cerebral traumática), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y otros trastornos neurodegenerativos. Como los inhibidores de ROCK reducen la proliferación celular y la migración celular, podrían ser útiles en el tratamiento del cáncer y de la metástasis tumoral. Finalmente, existen evidencias que sugieren que los

inhibidores de ROCK suprimen la redistribución citoesquelética tras la invasión vírica, de esta manera tienen también un valor terapéutico potencial en aplicaciones antivíricas y antibacterianas. Los inhibidores de ROCK son también útiles para el tratamiento de la resistencia a la insulina y la diabetes.

5 Inhibidor de ROCK Y-27632

La adhesión de células tumorales a las capas de células hospedadoras y la posterior migración transcelular son etapas fundamentales en la invasión y metástasis cancerosa. La GTPasa Rho pequeña controla la adhesión y motilidad celular a través de la reorganización del citoesqueleto de actina y la regulación de la contractilidad de la actomiosina.

10 Las células de hepatoma MM1 de rata cultivadas migran, de una manera mediada por Rho dependiente de suero, a través de una monocapa de células mesoteliales *in vitro*. Entre las diferentes proteínas aisladas como presuntas moléculas diana de Rho, se cree que las quinasas ROCK participan en la inducción de las adhesiones focales y las fibras de estrés en células cultivadas, y median en la sensibilización del calcio de la contracción del músculo liso potenciando la fosforilación de la cadena ligera reguladora de miosina. La transfección de células MM1 con ADNc que codifica un mutante activo dominante de ROCK confiere actividad invasiva independientemente del suero y Rho. Por el contrario, la expresión de un mutante de ROCK defectivo en quinasa dominante negativo, atenúa sustancialmente el fenotipo invasivo.

20 Un inhibidor específico de ROCK (Y-27632) bloquea la activación mediada por Rho de la actomiosina y la actividad invasiva de estas células. Además, la administración continua de este inhibidor usando bombas osmóticas redujo considerablemente la diseminación de células MM1 en la cavidad peritoneal de las ratas singénicas. Estos resultados indican que ROCK juega una parte esencial en la invasión de células tumorales, y demuestra su potencial como diana terapéutica para la prevención de la invasión y la metástasis cancerosa.

25 VEGF indujo la activación de RhoA y atrajo RhoA a la membrana celular de EC humana. Este aumento en la actividad de RhoA es necesario para la reorganización inducida por VEGF del citoesqueleto de actina F, tal como se demuestra por la transfección adenovírica de RhoA dominante negativo. La quinasa Rho medió este efecto de RhoA, tal como se demuestra mediante el uso Y-27632, un inhibidor específico de la quinasa Rho. La inhibición de la quinasa Rho evitó la migración de EC potenciada por VEGF en respuesta a la lesión mecánica, pero no tuvo efecto sobre la migración de EC basal. Además, en un modelo *in vitro* de la angiogénesis, la inhibición tanto de RhoA como de la quinasa Rho atenúa el crecimiento interno de EC mediado por VEGF en una matriz de fibrina tridimensional. CONCLUSIONES: los cambios citoesqueléticos en EC inducidos por VEGF necesitan RhoA y la quinasa Rho, y la activación de la señalización de RhoA/quinasa Rho está implicada en la migración de EC *in vitro* inducida por VEGF y en la angiogénesis.

35 Y-27632 puede relajar el músculo liso y aumentar el flujo sanguíneo vascular. Y-27632 es una molécula pequeña que puede penetrar en las células y no es tóxica en ratas tras la administración oral de 30 mg/kg durante 10 días. Las dosis eficaces para el uso de este compuesto son aproximadamente de 30 μ M. Esta reduce la tensión arterial en las ratas hipertensas, pero no afecta a la tensión arterial en ratas normales. Esto ha llevado a la identificación de los antagonistas de la señalización de Rho en el tratamiento de la hipertensión (Somlyo, 1997 Nature 389:908; Uehata y col., 1997 Nature 389:990).

40 El uso de un inhibidor específico de ROCK, Y-27632 (Uehata, y col., Nature, 389, 990, 994, 1997, Davies, y col., Biochemical Journal, 351,95-105, 2000, e Ishizaki, y col., Molecular Pharmacology., 57, 976-983, 2000), ha demostrado un papel para esta enzima en la regulación de la contracción independiente de Ca^{2+} en numerosos tejidos, incluyendo el vascular (Uehata, y col., Nature, 389, 990-994, 1997), las vías respiratorias (Ilikuka y col., European Journal of 30 Pharmacology., 406, 273-279, 2000) y genital (Chitaley y col., Nature Medicine., 7(1), 119 - 122, 2001) músculos lisos. Además, Jezior y col. British Journal of Pharmacology., 134, 78-87, 2001 han mostrado que Y-27632 atenúa las contracciones evocadas por betanecol en músculo liso aislado de vejiga urinaria de 35 conejos.

50 Se ha ensayado el inhibidor Y-27632 de la quinasa Rho para las siguientes aplicaciones para la enfermedad:

- Hipertensión (Uehata y col., 1997 IBID; Chitaley y col., 2001a IBID; Chrissobolis y 15 Sobey, 2001 C. Circ. Res 88:774)
- 55 • Asma (Iizuka y col., 2000 Eur. J. Pharmacol 406:273; Nakahara y col. Eur. J. Pharmacol 389:103, 2000)
- Vasoconstricción pulmonar (Takamura y col., 2001 Hepatology 33:577)
- 60 • Enfermedad vascular (Miyata y col., 2000 Thromb Vasc Biol 20:2351; Robertson y col., 2000 Br. J. Pharmacol 131:5)
- Disfunción eréctil del pene (Chitaley y col., 2001b Nature Medicine 7:119; Mills y col., 2001 J. Appl. Physiol. 91: 1269; Rees y col., Br. J. Pharmacol 133:455 2001)
- 65 • Glaucoma (Honjo y col., 2001 Methods Enzymol 42:137; Rao y col., 2001 Invest. Ophthalmol. Urs. Sci. 42:1029)

- Transformación celular (Sahai y col., 1999 Curr. Biol. 9:136-5)
- Metástasis de cáncer de próstata (Somlyo y col., 2000 BBRC 269:652)
- 5 • Carcinoma hepatocelular y metástasis (Imamura y col., 2000; Takamura y col., 2001)
- Fibrosis hepática (Tada y col., 2001 J. Hepatol 34:529; Wang y col., 2001 Am. J. Respir. Cell Mol Biol. 25:628)
- Fibrosis renal (Ohlci y col., J. Heart Lung Transplant 20:956 2001)
- 10 • Cardioprotección y supervivencia al injerto (Ohlci y col., 2001 IBID)
- Vasoespasmio cerebral (Sato y col., 2000 Circ. Res 87: 195).

15 Quinasa ROCK y enfermedad cardiovascular

20 Existe una evidencia creciente de que las ROCK, las dianas posteriores inmediatas de la proteína Rho pequeña de unión a trifosfato de guanosina, pueden contribuir a la enfermedad cardiovascular. Las ROCK juegan un papel central en diversas funciones celulares tales como la contracción del músculo liso, la formación de fibras de estrés y la migración y la proliferación celular. Se ha observado la hiperactividad de ROCK en isquemia cerebral, vasoespasmio coronario hipertensión, inflamación vascular, arterioesclerosis y aterosclerosis. Las ROCK, por tanto, pueden ser una diana terapéutica importante y todavía relativamente inexplorada en la enfermedad cardiovascular. Recientes estudios experimentales y clínicos utilizando inhibidores de ROCK tales como Y-27632 y fasudil han revelado un papel crítico de las ROCK en el desarrollo embrionario, la inflamación y la oncogénesis. Esta revisión se centrará en el papel potencial de las ROCK en las funciones celulares y describe las perspectivas de los inhibidores de ROCK como tratamiento emergente de enfermedades cardiovasculares.

30 La contractilidad anómala del músculo liso puede ser una causa principal de patologías tales como hipertensión, y los relajantes del músculo liso que modulan este proceso serían terapéuticamente útiles. La contracción del músculo liso está regulada por la concentración de Ca^{2+} citosólico y por la sensibilidad a Ca^{2+} de los miofilamentos: las actividades anteriores de la quinasa de la cadena ligera de miosina y la última se consigue parcialmente por la inhibición de la fosfatasa de la miosina.

35 Las rutas de señalización de Rho en las células del músculo liso vascular están muy activadas en la hipertensión, una dolencia asociada con una variedad de enfermedades vasculares, que incluyen la lesión por restenosis y la aterosclerosis.

40 La hipertensión es un trastorno cardiovascular caracterizado por una resistencia vascular periférica aumentada y/o una remodelación estructural vascular. Recientemente, evidencias rápidamente crecientes derivadas de modelos animales hipertensivos sugieren que la GTPasa Rho pequeña y su efector corriente abajo, la quinasa Rho, juegan un importante papel en la patogénesis de la hipertensión. La activación de la ruta de la quinasa Rho/Rho es esencial para la contractilidad del músculo liso en la hipertensión. Se ha observado una expresión mayor de RhoA y una actividad potenciada de RhoA en aortas de ratas hipertensas, tales como ratas espontáneamente hipertensas de forma genética e hipertensión inducida por éster metílico de la N(omega)-nitro-L-arginina.

45 Quinasa ROCK y enfermedades neurológicas

50 Se ha observado la activación anómala de la ruta Rho/ROCK en los diversos trastornos del sistema nervioso central La lesión en el cerebro y la médula espinal de vertebrados adultos activa ROCK, inhibiendo de esta forma el crecimiento y la aparición de brotes de neuritas. La inhibición de ROCK da como resultado la regeneración acelerada y la recuperación funcional potenciada tras la lesión de médula espinal en mamíferos, y la inhibición de la ruta Rho/ROCK ha probado también ser eficaz en modelos animales de ictus, enfermedades inflamatorias y desmielinantes, enfermedad de Alzheimer y dolor neuropático. Los inhibidores de ROCK tienen por tanto potencial para evitar la neurodegeneración y la estimulación de la neurodegeneración en diversos trastornos neurológicos.

55 El desarrollo de una neurona requiere una serie de etapas que comienzan con la migración desde su lugar de nacimiento y el inicio del proceso de extensión del crecimiento, y conduce en última instancia a la diferenciación y a la formación de conexiones que permiten a ésta comunicarse con las dianas adecuadas. Durante los últimos años, se ha puesto en evidencia que la familia Rho de las GTPasas y las moléculas relacionadas juega un importante papel en diversos aspectos del desarrollo neuronal, incluyendo la extensión del crecimiento y la diferenciación de neuritas, y la búsqueda de caminos de los axones, y la formación y el mantenimiento de espinas dendríticas.

60 Un denominador común en la inhibición de la extensión del crecimiento de neuritas y la repulsión de neuritas es la redistribución de neuritas en el cono de crecimiento. Un aspecto fundamental de la regulación del citoesqueleto de actina en células neuronales y no neuronales es la familia Rho de las GTPasas pequeñas. Los miembros de la familia Rho cambian de estado entre una forma inactiva unida a GDP y una forma activa unida a GTP. Algunas líneas de

evidencia sugieren que la manipulación del estado de actividad de las GTPasas Rho puede modular el colapso del cono de crecimiento y la inhibición de la extensión del crecimiento de neuritas.

Más recientemente, de forma conductual, la inactivación de la ruta de Rho puede inducir la recuperación rápida de la locomoción y la progresiva recuperación de la coordinación entre extremidades anteriores y extremidades posteriores. Estos hallazgos proporcionan evidencias de que la ruta de señalización de Rho es una diana potencial para las intervenciones terapéuticas tras la lesión de médula espinal.

Quinasa p70S6K

La proteína quinasa ribosómica p70S6K de 70 kDa (conocida también como SK6, quinasa S6 p70/p85, la quinasa S6 p70/p85 ribosómica y pp70s6k) es un miembro de la subfamilia AGC de proteínas quinasas. p70S6K es una serina-treonina quinasa que es un componente de la ruta de la fosfatidilinositol quinasa (PI3K)AKT. p70S6K está corriente abajo de PI3K, y la activación se produce a través de la fosforilación en numerosos sitios en respuesta a numerosos mitógenos, hormonas y factores de crecimiento. Esta respuesta puede ser bajo el control de mTOR debido a que rapamicina actúa para inhibir la actividad de p70S6K y bloquea la síntesis de proteínas, específicamente como resultado de una regulación por defecto de la traducción de estas proteínas ribosómicas que codifican el ARNm. p70S6K está regulado también por PI3K y su diana AKT corriente abajo. Wortmannina y rapamicina producen una disminución en la fosforilación de p70S6K en los sitios dependientes de la ruta de PI3K. El mutante p70S6K se inhibe por la wortmannina pero no por la rapamicina sugiriendo que la ruta de PI3K puede tener efectos sobre p70S6K independientes de la regulación de la actividad de mTOR.

La enzima p70S6K modula la síntesis de proteínas mediante la fosforilación de la proteína S6 ribosómica. La fosforilación de S6 está correlacionada con la traducción aumentada de los ARNm que codifican los componentes del aparato de traducción, que incluyen proteínas ribosómicas y factores de alargamiento traduccionales cuya expresión aumentada es esencial para el crecimiento y la proliferación celular. Estos ARNm contienen un tracto de oligopirimidina en su inicio 5' traduccional (denominado 5'TOP), que se ha mostrado que es esencial para su regulación durante la traducción.

Además de su implicación en la traducción, la activación de p70S6K se ha implicado también en el control del ciclo celular, diferenciación de células neuronales, regulación de la motilidad celular y en una respuesta celular que es importante en la metástasis tumoral, la respuesta inmune y la reparación del tejido. Los anticuerpos contra p70S6K disminuyen la respuesta mitógena que impulsa la entrada de los fibroblastos de rata en la fase S, que constituye una indicación de que la función de p70S6K es esencial para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Además, se ha identificado la inhibición de la proliferación del ciclo celular en la fase G1 a la fase S del ciclo celular por la rapamicina como una consecuencia de la inhibición de la producción de la forma activada de p70S6K, hiperfosforilada.

El supresor tumoral LKB1 activa AMPK que fosforila el complejo TSC1/2 en la ruta mTOR/p70S6K, se suministra por tanto a p70S6K a través de una ruta independiente de PKB. Las mutaciones en LKB1 producen el síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), en el que los pacientes con PJS tienen una probabilidad 15 superior a desarrollar cáncer que la población general. Además, 1/3 de los adenocarcinomas de pulmón hospedan mutaciones de LKB1 inactivantes.

Un papel de p70S6K en la proliferación celular tumoral y en la protección de células de la apoptosis se respalda basándose en su participación en la transducción de la señal del receptor del factor de crecimiento, la expresión en exceso y la activación en tejidos tumorales. Por ejemplo, Los análisis de las transferencias Northern y Western revelaron que la amplificación del gen PS6K se ve acompañada por los correspondientes aumentos en la expresión del ARNm y la proteína, respectivamente (Cancer Res. (1999) 59: 1408-11 - Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in Breast Cancer).

El cromosoma 17q23 está amplificado en hasta un 20% de tumores de mama primarios, en un 87% de tumores de mama que contienen mutaciones BRCA2 y en un 50% de tumores que contienen mutaciones BRCA1, así como en otros tipos de cánceres tales como el de páncreas, vejiga y neuroblastoma (véase M. Barlund, O Monni, J Kononen, R Cornelison, J Torhorst, G Sauter, O-P Kallioniemi y Kallioniemi A, Cancer Res. 2000, 60:5340-5346). Se ha mostrado que las amplificaciones de 17q23 en el cáncer de mama implican los genes PAT1, RAD51C, PS6K, y SIGMA1B (Cancer Res. (2000). 60, pp. 5371-5375).

Se ha identificado el gen p70S6K como la diana de la amplificación y la expresión en exceso en esta región, y se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre la amplificación y un pronóstico malo.

Se observa la inhibición clínica de la activación de p70S6K en pacientes con carcinoma renal tratados con CCI-779 (éster de rapamicina), un inhibidor de la quinasa mTOR anterior. Se ha notificado una asociación lineal entre la progresión de la enfermedad y la activación de la actividad de p70S6K.

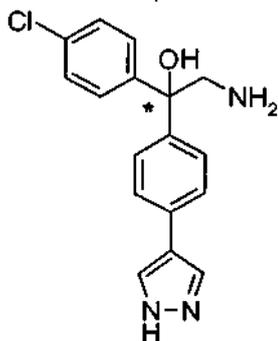
Se ha implicado a p70S6K en enfermedades y trastornos metabólicos. Se ha notificado que la ausencia de p70S6K protege frente a la obesidad inducida por la edad y la dieta a la vez que potencia la sensibilidad a la insulina. Un papel

para p70S6K en las enfermedades y trastornos metabólicos tales como la obesidad, diabetes, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, hiperglucemia, hiperaminoacidemia, e hiperlipidemia se apoya basándose en los hallazgos.

Compuestos de pirazol que tienen actividad inhibitora de PKB y PKA

5

Se han descrito varias clases de compuestos que tienen actividad inhibitora de PKA y PKB. Por ejemplo, el documento WO 2005/061463 (Astex) describe compuestos de pirazol que tienen actividad inhibitora de PKB y PKA y un compuesto concreto ejemplificado es 2-amino-1-(4-chloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol. Este compuesto, cuya estructura se muestra a continuación, tiene un centro quiral en el átomo de carbono marcado con un asterisco.

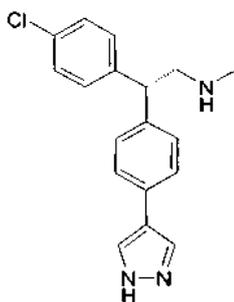


10

El compuesto descrito en el Ejemplo 84 del documento WO 2005/061463 es una mezcla racémica de los dos enantiómeros posibles. De acuerdo con los Ejemplos 106 y 107, el compuesto del Ejemplo 84 tiene valores de Cl_{50} en los ensayos de PKA y PKB *in vitro* respectivamente de menos de 1 micromolar en cada caso.

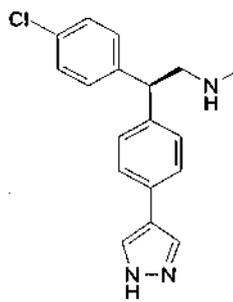
15

El documento WO 2005/061463 describe y ejemplifica también numerosos enantiómeros individuales, como se establece a continuación:



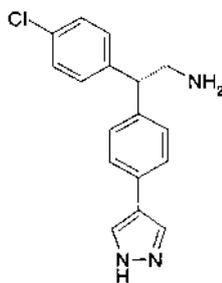
Isómero A

Documento WO 2005/061463 - Ejemplo 22



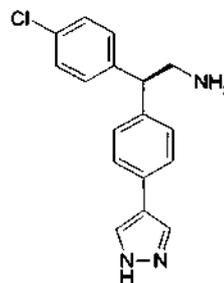
Isómero B

Documento WO 2005/061463 - Ejemplo 23



Isómero C

Documento WO 2005/061463 - Ejemplo 30



Isómero D

Documento WO 2005/061463 - Ejemplo 31

20

Los isómeros A y B constituye una pareja de enantiómeros y los isómeros C y D constituyen otra pareja de enantiómeros.

Los ensayos llevados a cabo por los presentes solicitantes han establecido que el isómero A es 10 veces más activo frente a PKB que su isómero B antípoda en un ensayo de unión. Análogamente, el isómero C es aproximadamente 10

veces más activo que su isómero D antípoda en un ensayo de unión. Sin embargo, en un ensayo ELISA celular mecanicista, los isómeros C y D son esencialmente equipotentes.

Sumario de la invención

5 Basándose en las actividades de los isómeros A, B, C y D descritos anteriormente se puede anticipar que los enantiómeros individuales del Compuesto del Ejemplo 84 del documento WO 2005/061463 mostrarían también una diferencia relativamente pequeña en la actividad.

10 Sin embargo, se ha encontrado ahora de la forma más inesperada que el enantiómero S del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol es 100 veces más activo (tal como se ha determinado mediante un ensayo de unión radiométrico) frente a PKB que el correspondiente enantiómero R. Además, mientras que los isómeros C y D anteriores son esencialmente equipotentes en el ensayo celular mecanicista, y el enantiómero S del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol tiene buena actividad en este ensayo, el enantiómero R no tiene actividad mensurable cuando se compara con las propiedades de los enantiómeros individuales conocidos A, B, C y D anteriores, las diferencias en la actividad entre los enantiómeros S y R del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol son muy sorprendentes y no podrían haberse previsto.

20 Se deriva de lo anterior que el enantiómero S del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol tiene sustanciales ventajas sobre su antípoda, el isómero R

Por consiguiente, En un primer aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el (S) 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol, al menos un 90% del cual está en la forma enantiomérica S.

25 El término "composición" tal como se usa en el presente documento se refiere a una composición de material e incluye composiciones que consisten únicamente en el 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol así como composiciones que contienen componentes adicionales. De acuerdo con la invención, al menos un 90% de todo el 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol presente en la composición debe estar en la forma S enantiomérica. Las composiciones pueden denominarse en el presente documento por comodidad como "las composiciones de la invención" o "las composiciones definidas en el presente documento" o "las composiciones".

35 La cantidad de (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol presente en una composición dada con respecto a la cantidad total de 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol de ambas formas enantioméricas presentes en la composición puede expresarse como "pureza enantiomérica". Por ejemplo, si el 90% del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol total presente en la composición está presente en la forma del enantiómero S, entonces la pureza enantiomérica es del 90%.

40 Preferentemente, (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol tiene una pureza enantiomérica de al menos un 90%, o al menos un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,5%.

En una realización preferida, más del 98% del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol está en la forma enantiomérica S.

45 En otra realización, al menos un 99,9% del 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol está en la forma enantiomérica S.

50 Preferentemente, esencialmente, el (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol no está presente en la composición. El término "esencialmente, el (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol no está presente en la composición" tal como se usa en la presente solicitud significa que no se puede detectar el enantiómero R utilizando los métodos analíticos descritos en el presente documento.

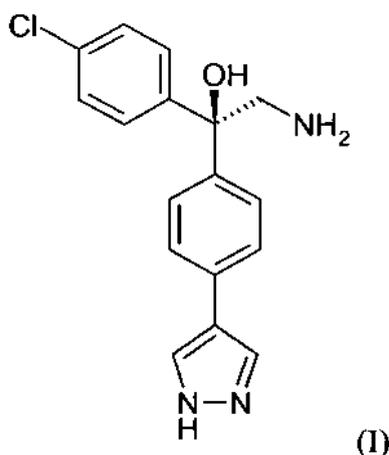
55 En una realización, la composición es una composición farmacéutica que contiene (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

60 En otra realización, la composición consiste en (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo, en forma sustancialmente pura, es decir, que contiene menos de un 0,5%. Más preferentemente menos de un 0,1% y lo más preferente menos de un 0,01% de impurezas.

En una realización preferida, no se encuentran presentes impurezas individuales en la composición en una cantidad correspondiente a más de un 0,2% en peso, de forma más preferente más de un 0,1% en peso.

65 En otra realización, en el que la identidad de la impureza es conocida, se prefiere que la impureza no esté presente en la composición en una cantidad mayor de 0,5%, o mayor del 0,4%, o mayor del 0,3%, o mayor del 0,2%, o mayor del 0,1%, o mayor del 0,05%, o mayor del 0,01%.

El (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol está representado por la fórmula (I) siguiente, y se puede denominar en el presente documento como el "compuesto de fórmula (I)" o "el enantiómero S".



5 El (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol puede denominarse por comodidad en el presente documento como "el enantiómero R".

Los términos "R" y "S" tal como se usan en el presente documento se refieren a la nomenclatura "R y S" desarrollada por Cahn, Ingold y Prelog, véase *Advanced Organic Chemistry* por Jerry March, 4ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York, 1992, páginas 109-114, y véase también Cahn, Ingold y Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5, 385-415.

Las composiciones de la invención pueden prepararse resolviendo parcial o completamente una mezcla de enantiómeros (S) y (R) de 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol, usando por ejemplo cromatografía quiral como se describe más adelante.

15 El (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol (es decir, el compuesto de fórmula (I)) tiene una proteína quinasa B (PKB) y/o una proteína quinasa A (PKA) que inhibe o modula la actividad, y es por tanto útil en la prevención o el tratamiento de patologías o dolencias mediadas por PKB y/o PKA.

20 En otro aspecto, la invención proporciona compuestos de la fórmula (I), es decir, el (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol, o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo, en forma sustancialmente pura, es decir, que contiene menos de un 0,5%. Más preferentemente menos de un 0,1% y lo más preferente menos de un 0,01% de impurezas.

25 En una realización, el compuesto es diferente de un N-óxido y se selecciona entre la base libre o una sal, solvato o tautómero del mismo.

En otra realización, el compuesto de fórmula (I) o un tautómero del mismo están en la forma de la base libre.

30 En una realización adicional, el compuesto de fórmula (I) o un tautómero del mismo están en la forma de una sal. Una sal concreta preparada de acuerdo la invención es la sal formada con ácido clorhídrico.

En aspectos adicionales, La invención proporciona:

35 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la proteína quinasa B.

40 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la proteína quinasa B.

45 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo para uso en el tratamiento de una enfermedad o dolencia que comprende o surge de un crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente en un mamífero.

50 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o dolencia comprende o surge de un crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente en un mamífero.

- Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para aliviar o reducir la incidencia de una enfermedad o dolencia que comprende o surge de un crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente en un mamífero.
- 5 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en la inhibición de la proteína quinasa B.
- Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en la modulación de un proceso celular (por ejemplo, la división celular)
- 10 inhibiendo la actividad de una proteína quinasa B y/o una proteína quinasa A.
- El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para modular un proceso celular (por ejemplo, la división celular) inhibiendo la actividad de una proteína quinasa B y/o una proteína quinasa A.
- 15 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la proteína quinasa A.
- El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la proteína quinasa A.
- 20 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para inhibir la proteína quinasa A.
- 25 • Un método para inhibir la proteína quinasa A, cuyo método comprende poner en contacto la quinasa con una composición inhibidora de quinasa o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento.
- 30 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia que surge del crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente.
- Una composición farmacéutica que comprende una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en medicina.
- 40 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de los patologías o dolencias descritas en el presente documento.
- 45 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para el tratamiento o la profilaxis de uno cualquiera de los patologías o dolencias descritas en el presente documento.
- El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa B.
- 50 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa B.
- 55 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa B.
- 60 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa A.
- 65 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una

patología o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa A.

- 5 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso como un modulador (por ejemplo, inhibidor) de la proteína quinasa B y/o la proteína quinasa A.
- 10 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para modular (por ejemplo, inhibir) la proteína quinasa B y/o la proteína quinasa A.
- 15 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK.
- 20 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para uso en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK.
- 25 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento en la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la quinasa ROCK.
- 30 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la quinasa ROCK.
- 35 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia que surge del crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente mediada por la quinasa ROCK.
- 40 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de los patologías o dolencias descritas en el presente documento.
- 45 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la quinasa ROCK.
- 50 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para uso en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K..
- 55 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para uso en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K..
- 60 • Una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en la profilaxis o tratamiento de una patología o dolencia mediada por la proteína quinasa p70S6K.
- 65 • El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de una

patología o dolencia que surge del crecimiento celular anómalo o de la muerte celular detenida anómalamente mediada por la proteína quinasa p70S6K.

- El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de los patologías o dolencias descritas en el presente documento.
- El uso de una composición o compuesto de fórmula (I), o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo tal como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la profilaxis de una patología o dolencia en un paciente que se ha cribado y se ha determinado que padece de, o está en riesgo de padecer de, una enfermedad o dolencia que sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa p70S6K.

La invención proporciona también combinaciones adicionales, usos, métodos, compuestos y procedimientos que se muestran en las siguientes reivindicaciones.

Preferencias y definiciones generales

Como se usa en este documento, El término "modulación", que se aplica a la actividad de una quinasa, se pretende que defina un cambio en el nivel de actividad biológica de la proteína quinasa. Por tanto, la modulación abarca cambios fisiológicos que tienen como efecto un aumento o disminución en la actividad relevante de la proteína quinasa. En el último caso, la modulación puede describirse como "inhibición". La modulación puede surgir directa o indirectamente, y puede estar mediada por cualquier mecanismo y a cualquier nivel fisiológico, incluyendo por ejemplo al nivel de la expresión génica (incluyendo por ejemplo la transcripción, la traducción y/o la modificación posterior a la traducción), al nivel de expresión de los genes que codifican elementos reguladores que actúan directa o indirectamente sobre los niveles de actividad de la quinasa. Por tanto, la modulación puede implicar una expresión elevada o suprimida o una expresión por exceso o por defecto de una quinasa, que incluye la amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y/o una expresión aumentada o disminuida por un efecto transcripcional, así como una hiper (o hipo) actividad y la (des)activación de la(s) proteína(s) quinasa(s) (incluyendo la (des)activación debida a mutación(ones). los términos "modulado", "que modula" y "modular" son para interpretarse de acuerdo con ello

Como se usa en este documento, Se pretende que el término "mediado", tal como se usa por ejemplo junto con una quinasa tal como se describe en el presente documento (y se aplica por ejemplo a diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, dolencias, terapias, tratamientos o intervenciones) enfermedades, estados, dolencias, tratamientos e intervenciones a las cuales se aplica el término son aquellos en los que la quinasa juega un papel biológico. En los casos en los que el término se aplica a una enfermedad, estado o dolencia, el papel biológico jugado por una quinasa puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para la manifestación de los síntomas de la enfermedad, estado o dolencia (o su etiología o progresión). Por tanto, la actividad de la quinasa (y en particular los niveles anómalos de actividad de la quinasa, por ejemplo, la expresión en exceso de la quinasa) no necesita necesariamente ser la causa próxima de la enfermedad, estado o dolencia: más bien, estado o dolencia, se contempla que las enfermedades, estados o dolencias mediados por quinasa incluyan aquellas que tienen etiologías multifactoriales y progresiones complejas en las que la quinasa en cuestión está solo parcialmente implicada. En los casos en los que el término se aplica al tratamiento, profilaxis o intervención, el papel jugado por la quinasa puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para el funcionamiento del tratamiento, profilaxis o resultado de la intervención. Por tanto, una patología o dolencia mediada por una quinasa incluye el desarrollo de resistencia a cualquier fármaco o tratamiento contra un cáncer concreto.

Como se usa en este documento, los términos "quinasa(s) ROCK" y "ROCK(s)" son términos genéricos sinónimos que abarcan todos los miembros de la familia de la quinasa ROCK, que incluyen de esta manera especies de ROCK1 y ROCK2 comprendidas en el género. Las referencias *entre otras* a los inhibidores de la quinasa ROCK, la modulación de la quinasa ROCK y la actividad de la quinasa ROCK deben interpretarse de acuerdo con ello.

El término "proteína Rho" es un término de la técnica usado para definir una gran familia de proteínas de unión a GTP que están implicadas en la regulación de la organización de la actina, incluyendo RhoA y RhoC.

Como se usa en este documento, el término "ruta de señalización de Rho" define cualquier ruta de señalización celular en la que están implicados uno o más miembros de las proteínas Rho. Particularmente relevante para la invención son las rutas de señalización de Rho en las que una quinasa ROCK (por ejemplo ROCK 1 y/o ROCK2 es un efector próximo (por ejemplo, un ligando) de una o más proteína(s) ROCK, y dichas rutas de señalización de Rho se prefieren en realizaciones de la invención definidas entre otras por referencia a una ruta de señalización de Rho.

Como se usa en este documento, El término "modulación", que se aplica a las ROCK que se describen en el presente documento, se pretende que defina un cambio en el nivel de actividad biológica de las ROCK. Por tanto, la modulación abarca cambios fisiológicos que tienen como efecto un aumento o disminución en la actividad de ROCK. En el último caso, la modulación puede describirse como "inhibición". La modulación puede surgir directa o indirectamente, y puede estar mediada por cualquier mecanismo y a cualquier nivel fisiológico, incluyendo por ejemplo al nivel de la

expresión génica (incluyendo por ejemplo la transcripción, la traducción y/o la modificación posterior a la traducción), en la expresión de los genes que codifican elementos reguladores que actúan directa o indirectamente sobre los niveles de actividad de ROCK. o en la actividad de la enzima (por ejemplo, ROCK) (por ejemplo, mediante mecanismos alostéricos, inhibición competitiva, inactivación de sitios activos, perturbación de rutas inhibitorias de la retroalimentación, etc.). Por tanto, la modulación puede implicar una expresión elevada o suprimida o una expresión por exceso o por defecto de la ROCK, que incluye la amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y/o una expresión aumentada o disminuida por un efecto transcripcional, así como una hiper (o hipo) actividad y la (des)activación de la ROCK (incluyendo la (des)activación debida a mutación(ones)). Los términos "modulado" y "modular" son para interpretarse de acuerdo con ello

Como se usa en este documento, Se pretende que el término "mediado", tal como se usa junto con las ROCK tal como se describe en el presente documento (y se aplica por ejemplo a diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, dolencias, terapias, tratamientos o intervenciones) enfermedades, estados, dolencias, tratamientos e intervenciones a las cuales se aplica el término son aquellos en los que ROCK juega un papel biológico. En los casos en los que el término se aplica a una enfermedad, estado o dolencia, el papel jugado por ROCK puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para la manifestación de los síntomas de la enfermedad, estado o dolencia (o su etiología o progresión). Por tanto, la actividad de ROCK (y en particular los niveles anómalos de actividad de ROCK, por ejemplo, la expresión en exceso de ROCK) no necesita necesariamente ser la causa próxima de la enfermedad, estado o dolencia: más bien, estado o dolencia, se contempla que las enfermedades, estados o dolencias mediados por ROCK incluyan aquellos que tienen etiologías multifactoriales y progresiones complejas en las que ROCK está solo parcialmente implicada. En los casos en los que el término se aplica al tratamiento, profilaxis o intervención (por ejemplo, en los "tratamientos mediados por ROCK" y "la profilaxis mediada por ROCK" de la invención), el papel jugado por ROCK puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para el funcionamiento del tratamiento, profilaxis o resultado de la intervención. Muchos procesos fisiológicos mediados por ROCK. enfermedades, estados, dolencias, terapias, tratamientos o intervenciones de la invención implican la ruta de señalización de Rho (tal como se define en el presente documento) y pueden por tanto, por extensión, denominarse procesos fisiológicos "mediados por Rho" enfermedades, estados, dolencias, terapias, tratamientos o intervenciones.

El término "indicado" es un término de la técnica utilizado en el presente documento en relación con una enfermedad dolencia, sujeto o población de pacientes para transmitir la deseabilidad o necesidad clínica de una intervención concreta en relación con la enfermedad, dolencia, sujeto o población de pacientes. Por tanto, las referencias en el presente documento a una enfermedad, dolencia, sujeto o población de pacientes "en los que está indicada la modulación (por ejemplo inhibición) de la quinasa ROCK" se pretende que definan aquellas enfermedades, etc., en las que la modulación de la quinasa ROCK es tanto clínicamente deseable como necesaria. Este puede ser el caso, por ejemplo, en el que la modulación de la quinasa ROCK sería paliativa, preventiva o (al menos parcialmente) curativa.

Como se usa en este documento, El término "modulación", que se aplica a la proteína quinasa P70S6K descrita en el presente documento, se pretende que defina un cambio en el nivel de actividad biológica de P70S6K. Por tanto, la modulación abarca cambios fisiológicos que tienen como efecto un aumento o disminución en la actividad de P70S6K.. En el último caso, la modulación puede describirse como "inhibición". La modulación puede surgir directa o indirectamente, y puede estar mediada por cualquier mecanismo y a cualquier nivel fisiológico, incluyendo por ejemplo al nivel de la expresión génica (incluyendo por ejemplo la transcripción, la traducción y/o la modificación posterior a la traducción), al nivel de expresión de los genes que codifican elementos reguladores que actúan directa o indirectamente sobre los niveles de actividad de P70S6K., o al nivel de actividad de la enzima (por ejemplo P70S6K) (por ejemplo, mediante mecanismos alostéricos, inhibición competitiva, inactivación de sitios activos, perturbación de rutas inhibitorias de la retroalimentación, etc.). Por tanto, la modulación puede implicar una expresión elevada o suprimida o una expresión por exceso o por defecto de P70S6K, que incluye la amplificación génica (es decir, múltiples copias de genes) y/o una expresión aumentada o disminuida por un efecto transcripcional, así como una hiper (o hipo) actividad y la (des)activación de P70S6K (incluyendo la (des)activación debida a mutación(ones)). Los términos "modulado" y "modular" son para interpretarse de acuerdo con ello

Como se usa en este documento, Se pretende que el término "mediado", tal como se usa junto con las P70S6K tal como se describe en el presente documento (y se aplica por ejemplo a diversos procesos fisiológicos, enfermedades, estados, dolencias, terapias, tratamientos o intervenciones) enfermedades, estados, dolencias, tratamientos e intervenciones a las cuales se aplica el término son aquellos en los que P70S6K juega un papel biológico. En los casos en los que el término se aplica a una enfermedad, estado o dolencia, el papel jugado por P70S6K puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para la manifestación de los síntomas de la enfermedad, estado o dolencia (o su etiología o progresión). Por tanto, la actividad de P70S6K (y en particular los niveles anómalos de actividad de P70S6K, por ejemplo, la expresión en exceso de P70S6K) no necesita necesariamente ser la causa próxima de la enfermedad, estado o dolencia: en su lugar, se considera que las enfermedades, estados o dolencias mediadas por P70S6K incluyen aquellos que tienen etiologías multifactoriales y progresiones complejas en las que P70S6K está solo parcialmente implicada. En los casos en los que el término se aplica al tratamiento, profilaxis o intervención (por ejemplo, en los "tratamientos mediados por P70S6K" y "la profilaxis mediada por P70S6K" de la invención), el papel jugado por P70S6K puede ser directo o indirecto y puede ser necesario y/o suficiente para el funcionamiento del tratamiento, profilaxis o resultado de la intervención.

El término "intervención" es un término de la técnica usado en el presente documento para definir cualquier organismo que efectúa un cambio un cambio fisiológico a cualquier nivel. Por tanto, la intervención puede comprender la inducción o represión de cualquier proceso fisiológico, acontecimiento, ruta bioquímica o acontecimiento celular/bioquímico. Las intervenciones de la invención afectan normalmente (o contribuyen a) la terapia, tratamiento o profilaxis de una enfermedad o dolencia.

A no ser que el contexto indique otra cosa, las referencias en el presente documento a (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol, o al compuesto de fórmula (I) o al enantiómero S incluyen la base libre así como las formas iónicas de sales solvatas, N-óxidos, tautoméricas y protegidas de los mismos, por ejemplo, tal como se discute a continuación.

El compuesto puede ser diferente que un N-óxido. Por ejemplo, en una realización, el compuesto de fórmula (I) es diferente de un N-óxido y está en la forma de la base libre.

En otra realización, el compuesto de fórmula (I) es diferente de un N-óxido y está en la forma de una sal.

Pueden seleccionarse y prepararse formas salinas de acuerdo con los métodos descritos en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 páginas, agosto de 2002 Por ejemplo, se pueden preparar sales de adición de ácido disolviendo la base libre en un disolvente orgánico en el que una forma salina dada es insoluble o muy poco soluble y añadiendo a continuación el ácido requerido en un disolvente adecuado de tal manera que la sal precipita fuera de la disolución.

Se pueden formar sales de adición de ácido con una amplia variedad de ácidos, inorgánicos y orgánicos. los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen las sales formadas con un ácido seleccionado entre el grupo que consiste en los ácidos acético, 2,2-dicloroacético, adípico, alginico, ascórbico (por ejemplo, L-ascórbico), L-aspártico, bencenosulfónico, benzoico, 4-acetamidobenzoico, butanoico, (+) alcanfórico, alcanforsulfónico, (+)-(1S)-alcanfor-10-sulfónico, cáprico, caproico, caprílico, cinámico, cítrico, ciclámico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-disulfónico, etanosulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, glucoheptónico, D-glucónico, glucurónico (por ejemplo, D-glucurónico), glutámico (por ejemplo, L-glutámico), α -oxoglutarico, glicólico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, isetiónico, láctico (por ejemplo (+)-L-láctico y (\pm)-DL-láctico), lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, (\pm)-DL-mandélico, metanosulfónico, naftalenosulfónico (por ejemplo naftalen-2-sulfónico), naftalen-1,5-disulfónico, 1-hidrox-2-naftoico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamoico, fosfórico, propiónico, L-piroglutámico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tánico, (+)-L-tartárico, tiocianico, toluenosulfónico (por ejemplo, p-toluenosulfónico), undecilénico y valérico, así como los aminoácidos acilados y las resinas de intercambio catiónico.

Un grupo particular de sales de adición de ácido incluyen las sales formadas con los ácidos clorhídrico, yodhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, acético, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico. En este grupo de sales, un subconjunto de sales consiste en las sales formadas con ácido clorhídrico o ácido acético.

Otro grupo de sales de adición de ácido incluyen las sales formadas a partir de los ácidos acético, adípico, ascórbico, aspártico, cítrico, DL- Láctico, fumárico, glucónico, glucurónico, hipúrico, clorhídrico, glutámico, DL-málico, metanosulfónico, sebácico, esteárico, succínico y tartárico.

El compuesto de fórmula (I) puede existir como monosales o disales dependiendo del pKa del ácido a partir del cual se forma la sal. En ácidos más fuertes, el nitrógeno básico del pirazol, así como el átomo de nitrógeno en el grupo amino, puede tomar parte en la formación de la sal. Por ejemplo, cuando el ácido tiene un pKa de menos de aproximadamente 3 (por ejemplo, un ácido tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido trifluoroacético), el compuesto de fórmula (I) formará normalmente sales con 2 equivalentes molares del ácido.

Las formas salinas del compuesto de fórmula (I) son normalmente sales farmacéuticamente aceptables, y se describen ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables en Berge y col., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," J. Pharm. Sci., Vol. 66, pp. 1-19. Sin embargo, se pueden preparar también sales que no son farmacéuticamente aceptables como formas intermedias que se pueden convertir a continuación en sales farmacéuticamente aceptables. Dichas formas salinas no farmacéuticamente aceptables, que pueden ser útiles, por ejemplo, en la purificación o separación del compuesto de fórmula (I), forman parte también de la invención.

El compuesto de fórmula (I) puede también formar N-óxidos y dichos N-óxidos están comprendidos en el alcance de la definición del compuesto de fórmula (I).

En una realización general, el compuesto de fórmula (I) no es un N-óxido.

Se pueden formar N-óxidos mediante el tratamiento de la amina progenitora con un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o un perácido (por ejemplo, un ácido peroxicarboxílico). Véase por ejemplo *Advanced Organic*

Chemistry, por Jerry March, 4ª edición, Wiley Interscience, páginas. Más particularmente, se pueden preparar N-óxidos mediante el procedimiento de L. W. Deady (Syn. Comm. 1977, 7, 509-514) en el que se hace reaccionar el compuesto de amina con ácido m-cloroperoxibenzoico (MCPBA), por ejemplo, en un disolvente inerte tal como diclorometano.

5 El compuesto de fórmula (I) se puede preparar a partir de una mezcla racémica del enantiómero S y el enantiómero R utilizando una técnica de separación adecuada tal como la cromatografía quiral (cromatografía sobre un soporte quiral) y dichas técnicas son bien conocidas por una persona experta en la materia.

10 Como una alternativa a la cromatografía quiral, los enantiómeros se pueden separar formando sales diastereoisoméricas con ácidos quirales tales como ácido (+)-tartárico, ácido (-)-piroglutámico, ácido (-)-di-toluloil-L-tartárico, ácido mandélico, ácido (-)-málico, y ácido (-)-alcanforsulfónico, separando los diastereoisómeros mediante cristalización preferencial, y disociando a continuación las sales para dar el enantiómero individual de la base libre.

15 El compuesto de fórmula (I) incluye las variantes con una o más sustituciones isotópicas, y una referencia a un elemento concreto incluye en su alcance todos los isótopos del elemento. Por ejemplo, una referencia a hidrógeno incluye en su alcance ^1H , ^2H (D), y ^3H (T). Análogamente, las referencias al carbono y al oxígeno incluyen en su alcance respectivamente ^{12}C , ^{13}C y ^{14}C y ^{16}O y ^{18}O .

20 Los isótopos pueden ser radioactivos o no radioactivos. En una realización de la invención, los compuestos no contienen isótopos radioactivos. Se prefieren dichos compuestos para el uso terapéutico. En otra realización, sin embargo, el compuesto puede contener uno o más radioisótopos. Los compuestos que contienen dichos radioisótopos pueden ser útiles en un contexto diagnóstico.

25 Abarcadas también por la fórmula (I) están cualesquiera formas polimórficas de los compuestos, solvatos (por ejemplo, hidratos), complejos (por ejemplo, complejos de inclusión o clatratos con compuestos tales como ciclodextrinas, o complejos con metales) de los compuestos, y profármacos de los compuestos. Por "profármacos" se entiende por ejemplo cualquier compuesto que se convierte *in vivo* en una composición biológicamente activa tal como se define en el presente documento.

30 Por ejemplo, algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo, un éster metabólicamente lábil fisiológicamente aceptable). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) se escinde para dar como resultado el fármaco activo. Dichos ésteres pueden formarse mediante esterificación, por ejemplo, de cualquiera de los grupos hidroxilo (-C(=O)OH) en el compuesto progenitor, con, cuando sea adecuado, la protección previa de cualesquiera otros grupos reactivos en el compuesto progenitor, seguido si se requiere por la desprotección.

Los ejemplos de dichos ésteres metabólicamente lábiles incluyen aquellos de la fórmula -C(=O)OR donde R es:

40 alquilo C_{1-7} ,
(por ejemplo, -Me, -Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, -tBu);
aminoalquilo C_{1-7} ,
(por ejemplo, aminoetilo; 2-(N,N-dietilamino)etilo; 2-(4-morfolino)etilo); y
45 aciloxi-alquilo C_{1-7} ,
(por ejemplo, aciloximetilo;
aciloxietilo;
pivaloiloximetilo;
acetoximetilo;
1-acetoxietilo;
50 1-((1-metoxi-1-metil)etil-carboniloxietilo;
1-((benzoiloxi)etilo; isopropoxi-carboniloximetilo;
1-isopropoxi-carboniloxietilo; ciclohexil-carboniloximetilo;
1-ciclohexil-carboniloxietilo;
ciclohexiloxi-carboniloximetilo;
55 1-ciclohexiloxi-carboniloxietilo;
(4-tetrahidropirani) carboniloximetilo;
1-((4-tetrahidropirani) carboniloxietilo;
(4-tetrahidropirani) carboniloximetilo; y 1-((4-tetrahidropirani) carboniloxietilo).

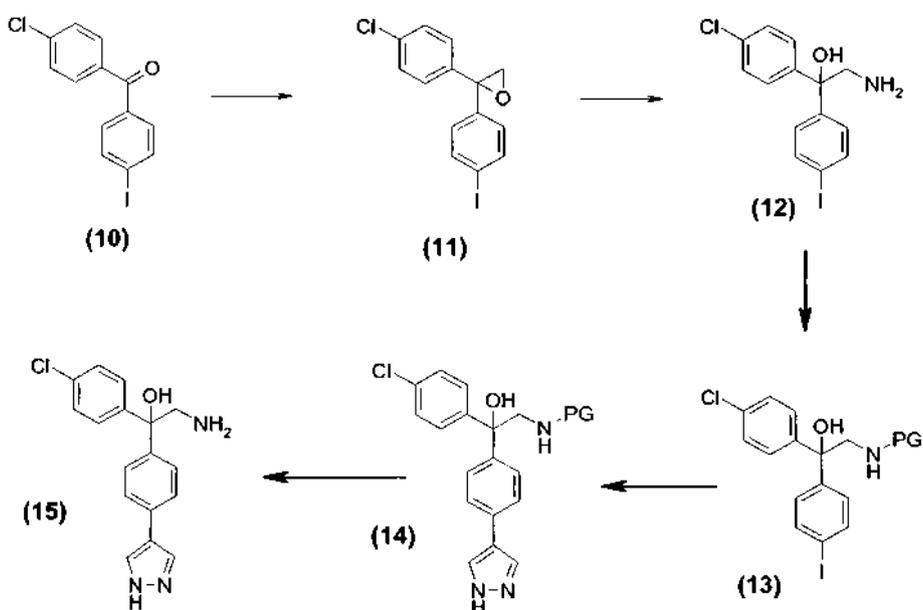
60 Asimismo, algunos profármacos se activan enzimáticamente para dar como resultado el compuesto activo, o un compuesto que, tras la reacción química adicional, da como resultado el compuesto activo (por ejemplo, como en un tratamiento con profármacos con enzima dirigida por anticuerpo (ADEPT) Terapia de profármacos con enzima dirigida por gen (GDEPT) Terapia de profármacos con enzima dirigida por ligando (LIDEPT) etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado de glicósido, o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

Métodos sintéticos

El compuesto de la fórmula (I) y su enantiómero R y sus mezclas se pueden preparar mediante los métodos que se muestran en el Esquema 1.

En el Esquema 1, la benzofenona sustituida (10) se convierte en el epóxido (11) mediante la reacción con yoduro de trimetil sulfonio en dimetilsulfóxido en presencia de una base (por ejemplo, una base hidruro tal como hidruro de sodio). A continuación se hace reaccionar el epóxido (11) con amoníaco en un disolvente alcohólico tal como metanol, normalmente con calentamiento, para dar la amina (12) como una mezcla racémica de los enantiómeros R y S.

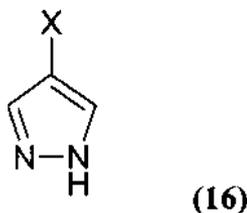
Se puede hacer reaccionar la amina (12) directamente con un boronato de pirazol (tal como el 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol) en presencia de un catalizador de paladio (tal como tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0)) bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para dar el compuesto racémico (15). Sin embargo, se ha encontrado que haciendo reaccionar la amina sin proteger bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki proporciona rendimientos de producto relativamente malos y el producto es relativamente difícil de purificar debido a su baja solubilidad. Este problema se supera protegiendo en primer lugar el grupo amino (por ejemplo, con un grupo Boc por el que PG = Boc) para dar el intermedio protegido (13) y sometiendo a continuación el intermedio (13) a un acoplamiento de Suzuki para dar el compuesto protegido (14). El compuesto protegido (14) se desprotege a continuación mediante métodos bien conocidos (usando por ejemplo HCl en el éter/metanol cuando PG = Boc) para dar el producto (15) como una mezcla racémica.

**Esquema 1**

La mezcla racémica (15) puede resolverse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la materia, usando por ejemplo los métodos de cromatografía quiral y otros métodos descritos en el presente documento.

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (15) comprende la eliminación de un grupo protector PG procedente de un compuesto del compuesto (14) y separando opcionalmente posteriormente los isómeros ópticos del compuesto (15) y aislando el enantiómero S del mismo. La invención proporciona también un compuesto que se puede preparar mediante el procedimiento anterior, así como un compuesto de la fórmula (15) preparado siempre mediante dicho procedimiento.

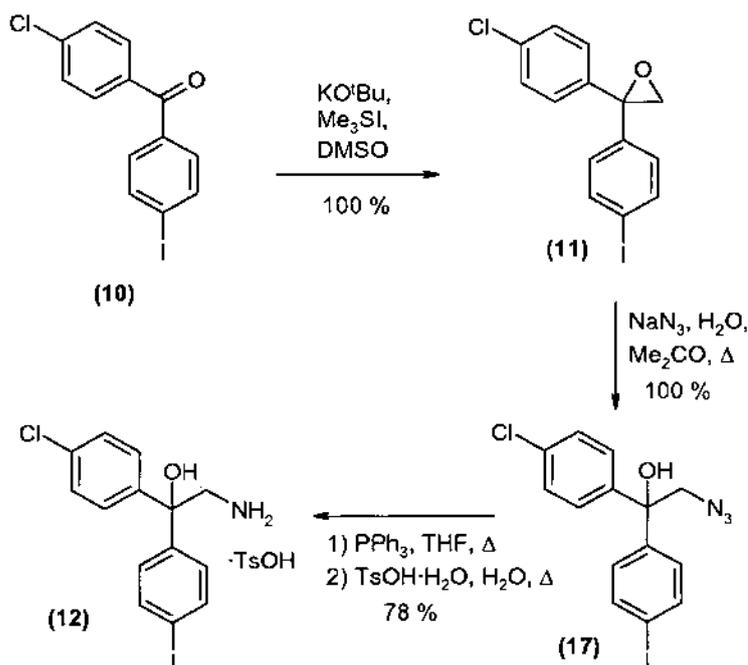
Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula (15) que comprende (i) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula (13) con un derivado de pirazol de la fórmula (16)



donde X es un grupo $B(OH)_2$ o un grupo de éster de boronato (tal como un grupo 4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl en presencia de un catalizador de paladio (tal como tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0)) bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para dar un compuesto de la fórmula (14); (ii) eliminando el grupo protector de PG procedente del compuesto del compuesto (14) y posteriormente (iii) separando opcionalmente los isómeros ópticos del compuesto (15) y aislando el enantiómero S del mismo.

Como una alternativa a los métodos descritos anteriormente e ilustrados en el Esquema 1, el compuesto de fórmula (I) se puede preparar siguiendo el método descrito en el Ejemplo 84 del documento WO 2005/061463 (Astex) y a continuación aislando el enantiómero S usando los métodos de separación descritos anteriormente y en otras partes en el presente documento.

En el Esquema 2 se ilustra un procedimiento mejorado para preparar el compuesto intermedio (12).



Esquema 2

En el Esquema 2, la benzofenona sustituida (10) se convierte en el epóxido (11) mediante reacción con yoduro de trimetil sulfonio en dimetilsulfóxido en presencia de una base tal como se describe en el Esquema 1 anterior, excepto que la base de hidruro de sodio se sustituye con terc-butóxido de potasio. El terc butóxido de potasio se añade a una mezcla rápidamente agitada de la benzofenona (10) y el yoduro de trimetilsulfonio, normalmente a temperatura ambiente. El uso del terc butóxido de potasio como la base más bien que hidruro de sodio confiere significativas ventajas. En primer lugar, en lugar de formar el anión dimsil mediante reacción de la base con DMSO y a continuación añadir los otros reactivos, como en el caso cuando se usa el hidruro de sodio como base, se puede añadir el terc butóxido a una mezcla preformada de la benzofenona (10), yoduro de trimetilsulfonio y dimetilsulfóxido. Esto significa que el anión dimsil se consume muy rápidamente después que se forma y por tanto, solo pequeñas cantidades del anión dimsil están presentes en la mezcla de reacción en algún momento dado. de esta manera, el uso del terc butóxido de potasio evita la formación de grandes concentraciones del dimsil sodio relativamente viscoso y algo peligroso. Además de mejorar la seguridad del procedimiento, la ausencia de grandes concentraciones del dimsilsodio viscoso significa que la mezcla de reacción es mucho más fácil de agitar lo que permite una mezcla más eficaz de los reactivos y la evitación de bolsas localizadas de materiales sin reaccionar o reaccionados de manera incompleta, una ventaja que está potenciada por el hecho de que el terc butanol formado durante la reacción es un buen disolvente para los reactivos y el producto. Estos beneficios son particularmente evidentes cuando la reacción se lleva a cabo a una escala mayor (por ejemplo, para preparar cantidades de 50 gramos o más del epóxido (11) en el que se ha encontrado que el uso del terc butóxido de potasio proporciona un aumento de rendimientos sustancialmente mejores del epóxido (11) y una pureza mejor (en comparación con las reacciones que utilizan hidruro de sodio como base).

En la secuencia de reacción que se muestra en el Esquema 1, epóxido (11) se hace reaccionar con amoníaco en un disolvente alcohólico tal como metanol con calentamiento, para dar la amina (12). Se pueden llevar a cabo reacciones de este tipo en un reactor microondas, normalmente a presión y proporcionare buenos rendimientos y pureza en reacciones relativamente a pequeña escala.

Sin embargo, para reacciones a mayor escala (por ejemplo, para producir cantidades de 50 gramos o más de la amina **(12)**), se ha encontrado que haciendo reaccionar el epóxido **(11)** con azida de sodio y reduciendo a continuación la azida intermedia **(17)** a la amina **(12)** proporciona mejores rendimientos y una mayor pureza. La reacción del epóxido **(11)** con la azida de sodio se lleva a cabo normalmente en un disolvente polar, por ejemplo, un disolvente acuoso que comprende agua y un disolvente miscible en agua tal como acetona. La reacción se lleva a cabo normalmente con calentamiento, por ejemplo, a la temperatura de reflujo del sistema disolvente.

la conversión del azido alcohol **(17)** al amino alcohol **(12)** puede conseguirse mediante reacción con trifenil fosfina seguido por tratamiento con un ácido acuoso y particularmente una disolución acuosa de un ácido sulfónico sustituido, preferentemente un ácido alquil o arilsulfónico tal como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido benceno sulfónico, ácido toluenosulfónico o ácido alcanforsulfónico. Se prefiere particularmente el uso del ácido 4-toluensulfónico. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se cree que la reacción avanza mediante ciclación inicial para formar una aziridina seguido por la apertura del anillo en presencia del ácido para dar el alcohol amino. Usando un ácido (particularmente ácido 4-toluensulfónico), el aminoalcohol se puede aislar como estable, la sal es fácil de manipular y se purifica fácilmente. Si se usa la forma ópticamente activa del ácido alcanforsulfónico (por ejemplo, ácido *d*-alcanforsulfónico) se puede llevar a cabo la cristalización fraccionada de la sal para separar las sales individuales de los dos enantiómeros del aminoalcohol **(12)**. El tratamiento de las sales con base proporciona a continuación los enantiómeros individuales del aminoalcohol **(12)**.

En cada una de las anteriores tres realizaciones, las sales de adición de ácido preferidas son sales formadas con ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido benceno sulfónico, ácido toluenosulfónico o ácido alcanforsulfónico (por ejemplo ácido alcanforsulfónico). Una sal particularmente preferida es la sal formada con ácido 4-toluensulfónico.

Además de ser útil como un intermedio sintético, el compuesto de la fórmula **(12)** y sus sales de adición de ácido tienen actividad frente a la quinasa PKB y, de este modo, deben ser útiles en el tratamiento, y en particular para los usos (por ejemplo, usos anticancerosos) descritos en el presente documento para el compuesto de fórmula **(1)**. Las composiciones farmacéuticas que contienen el compuesto de fórmula **(12)** o una sal de adición de ácido del mismo que se define en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable, y los usos terapéuticos del compuesto de fórmula **(12)** o sus sales de adición de ácido constituyen aspectos adicionales de la invención.

Un método para preparar una forma ópticamente activa de un compuesto de la fórmula **(12)** comprende fraccionada de una sal de adición de ácido del compuesto de la fórmula **(12)**, donde la sal se deriva de un ácido ópticamente activo (por ejemplo, ácido *d*-alcanforsulfónico).

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de la fórmula **(12)** tal como se define en el presente documento comprende la reacción de un compuesto de la fórmula **(17)** con una fosfina terciaria tal como trifenilfosfina en un disolvente aprótico polar tal como tetrahidrofurano a una temperatura por encima de la temperatura ambiente (por ejemplo, a la temperatura de reflujo del disolvente) seguido por tratamiento con una disolución acuosa de ácido, por ejemplo, un ácido sulfónico sustituido tal como ácido 4-toluensulfónico.

Como una alternativa a la trifenilfosfina, se pueden usar otras fosfinas terciarias y estas incluyen otras triarilfosfinas tales como tritolilfosfina, trialquilfosfinas tales como tributilfosfina, tricicloalquilfosfinas tales como triciclohexilfosfina, y fosfinas terciarias que contienen mezclas de grupos arilo y/o alquilo y/o cicloalquilo. Sin embargo, se prefiere la trifenilfosfina.

Como una alternativa al ácido 4-toluensulfónico, se pueden usar otros ácidos sulfónicos sustituidos; por ejemplo ácido alquil o arilsulfónico tal como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido benceno sulfónico, y ácido alcanforsulfónico, tal como se ha descrito anteriormente.

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula **(17)**; cuyo procedimiento comprende la reacción de un compuesto epóxido de la fórmula **(11)** con una azida de metal alcalino (por ejemplo, azida de sodio) o trimetilsililazida (TMS-azida) en un disolvente polar (por ejemplo, un disolvente orgánico acuoso tal como una disolución acuosa de acetona), preferentemente con calentamiento (por ejemplo, a la temperatura de reflujo del disolvente)

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula **(12)** comprende las etapas de:

(a) la reacción de un compuesto de la fórmula **(11)** tal como se define en el presente documento con una azida de metal alcalino (tal como azida de sodio) o trimetilsilil azida para formar un compuesto de la fórmula **(17)**;

(b) la reacción del compuesto de la fórmula **(17)** con (i) una fosfina terciaria tal como trifenilfosfina, seguido por (ii) un ácido tal como por ejemplo un ácido sulfónico sustituido, preferentemente un ácido alquil o arilsulfónico tal como ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico ácido toluenosulfónico, y lo más preferente ácido 4-toluensulfónico.

En cada uno de los procedimientos anteriores que implican el uso de una azida, se prefieren las azidas de metales alcalinos (por ejemplo, azida de litio, azida de potasio y azida de sodio) y la más preferida es la azida de sodio.

Un procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (15), el 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol comprende:

- 5 (1) preparar un compuesto de la fórmula (12) mediante un método que se define en el presente documento;
- (2) proteger el grupo amino del compuesto de fórmula (12) mediante un método que se define en el presente documento para dar un compuesto de fórmula (13);
- (3) haciendo reaccionar un compuesto de la fórmula (13) con un derivado de pirazol de la fórmula (16) que se define en el presente documento en presencia de un catalizador de paladio (tal como tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0)) bajo condiciones de acoplamiento de Suzuki para dar un compuesto de la fórmula (14);
- 10 (4) eliminar el grupo protector PG procedente del compuesto de la fórmula (14); y opcionalmente por tanto
- (5) separar los isómeros ópticos del compuesto (15) y aislar el enantiómero S del mismo

Formulaciones farmacéuticas

15 Aunque es posible para el compuesto de fórmula (I) administrarse solo, se prefiere que la composición de la invención sea una composición farmacéutica (por ejemplo, formulación) que comprende un compuesto de fórmula (I) junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, adyuvantes, excipientes, diluyentes, cargas, tampones, estabilizantes, conservantes, lubricantes, u otros materiales bien conocidos por los expertos en la materia y opcionalmente otros agentes terapéuticos o profilácticos.

20 Por tanto, la presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas. como se ha definido anteriormente, y los métodos de preparar una composición farmacéutica que comprende premezclar el compuesto de fórmula (I) junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes, tampones, adyuvantes, estabilizantes, u otros materiales, tal como se describe en el presente documento.

25 El término "farmacéuticamente aceptable", tal como se usa en el presente documento pertenece a compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para uso en contacto con los tejidos de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) sin una excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, y está en consonancia con una relación beneficio/riesgo razonable. Cada portador, excipiente, etc., debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación.

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen la composición que se define en el presente documento se pueden formular de acuerdo con las técnicas conocidas, véase por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA,

35 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención proporciona la composición que se define en el presente documento en la forma de una composición farmacéutica.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración por vía oral, parenteral, tópica, intranasal, oftálmica, ótica, rectal, intravaginal, o transdérmica. Cuando las composiciones están previstas para la administración parenteral, pueden formularse para la administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o para la administración directa en un órgano o tejido diana mediante inyección, infusión u otros medios de administración. La administración puede ser mediante inyección en bolo, infusión a corto plazo o infusión a largo plazo y pueden ser mediante administración pasiva o a través de la utilización de una bomba de infusión adecuada.

45 Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, codisolventes mezclas de disolventes orgánicos, agentes de complejación con ciclodextrina, agentes emulsionantes (para formar y estabilizar las formulaciones en emulsión), componentes liposómicos para formar liposomas, polímeros gelificables para formar geles poliméricos, protectores de la liofilización y combinaciones de agentes para, *entre otros*, estabilizar el principio activo en una forma soluble y volviendo la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto. Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden tomar también la forma de suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes (R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, p 201-230).

50 Los liposomas son vesículas esféricas cerradas compuestas por membranas externas de una bicapa lipídica y un núcleo interno acuoso y con un diámetro global de <100 µm. dependiendo del nivel de hidrofobicidad, los fármacos moderadamente hidrófobos se pueden solubilizar por liposomas si el fármaco llega a encapsularse o intercalarse en el liposoma. Se pueden solubilizar también los fármacos hidrófobos por liposomas si la molécula del fármaco llega a ser una parte integral de la membrana de la bicapa lipídica, y en este caso, el fármaco hidrófobo se disuelve en la porción lipídica de la bicapa lipídica.

65 Las formulaciones se pueden presentar en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales precintados, y se pueden almacenar en forma criodesecada (liofilizada) que solamente requiera la adición de un

vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso.

La formulación farmacéutica se puede preparar liofilizando un compuesto de fórmula (I). La liofilización se refiere al procedimiento de criocongelación de una composición. la criocongelación y la liofilización se utilizan por tanto en el presente documento como sinónimos.

Se pueden preparar disoluciones y suspensiones improvisadas para inyección a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para la inyección parenteral comprenden disoluciones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, dispersiones, suspensiones o emulsiones así como polvos estériles para la reconstitución en disoluciones o dispersiones inyectables estériles exactamente antes del uso. Los ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), las carboximetilcelulosas y sus mezclas adecuadas, aceites vegetales (como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la presente invención pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, paraben, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. Puede ser también deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir aproximadamente mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como monostearato de aluminio y gelatina.

En una realización preferida de la invención, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración i.v. por ejemplo, mediante inyección o infusión. Para administración intravenosa, la disolución se puede dosificar como tal, o se puede inyectar en una bolsa de infusión (que contiene un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina al 0,9% o dextrosa al 5%), antes de la administración.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica está en una forma adecuada para la administración subcutánea (s.c.).

Las formas farmacéuticas adecuadas para la administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, jarabes, disoluciones, polvos, gránulos, elíxires y suspensiones, comprimidos sublinguales, obleas o parches y parches bucales.

Por tanto, las composiciones para comprimidos pueden contener una unidad de dosificación del compuesto activo junto con un diluyente o portador inerte tal como un azúcar o alcohol azucarado, por ejemplo; lactosa, sacarosa, sorbitol o manitol; y/o un diluyente no derivado de azúcares tal como carbonato de sodio, fosfato de calcio, carbonato cálcico, o una celulosa o derivado de la misma tal como metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropil metil celulosa, y almidones tales como almidón de maíz. Los comprimidos pueden contener también dichos ingredientes normalizados como agentes de unión y agentes de granulación tales como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por ejemplo, polímeros reticulados hinchables tales como carboximetilcelulosa reticulada), agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos), conservantes (por ejemplo, parabenos), antioxidantes (por ejemplo, BHT), agentes tamponantes (por ejemplo, tampones fosfato o citrato), y agentes efervescentes tales como mezclas de citrato/carbonato. Dichos excipientes son bien conocidos y no necesitan describirse con detalle aquí.

Las formulaciones en cápsula pueden ser de una variedad de gelatina dura o de gelatina blanda y pueden contener el componente activo en forma sólida, semisólida, o forma líquida. Las cápsulas de gelatina pueden estar formadas de gelatina animal o derivados sintéticos o vegetales equivalentes de los mismos.

Las formas farmacéuticas sólidas (por ejemplo; comprimidos, cápsulas, etc.) pueden estar revestidos o no revestidos, pero normalmente tienen un revestimiento, por ejemplo, un revestimiento de película protectora (por ejemplo, una cera o barniz) o un revestimiento que controla la liberación. El revestimiento (por ejemplo, un polímero de tipo Eudragit™) se pueden diseñar para liberar el componente activo en una localización deseada en el tracto gastrointestinal. Por tanto, El revestimiento puede seleccionarse de tal manera que se degrade en determinadas condiciones de pH en el tracto gastrointestinal, para liberar por tanto selectivamente el compuesto en el estómago o en el íleo o el duodeno.

En vez de, o además de, un revestimiento, el fármaco puede presentarse en una matriz sólida que comprende un agente de control de la liberación, por ejemplo, un agente retardante de la liberación que se puede adaptar a liberar selectivamente el compuesto bajo condiciones de acidez o alcalinidad variable en el tracto gastrointestinal. Como alternativa, el material de la matriz o el revestimiento retardante de la liberación puede tomar la forma de un polímero erosionable (por ejemplo, un polímero de anhídrido maleico) que se erosiona sustancialmente de forma continua a medida que la forma farmacéutica pasa a través del tracto gastrointestinal. Como alternativa adicional, el compuesto

activo puede formularse en un sistema de administración que proporciona un control osmótico de la liberación del compuesto. se pueden preparar formulaciones para la liberación osmótica y otras formulaciones para la liberación retardada o la liberación sostenida de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

5 Las composiciones farmacéuticas comprenden de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 95%, preferentemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 90%, de principio activo. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar, por ejemplo, en forma de dosis unitaria, tal como en forma de ampollas, viales, supositorios, grageas, comprimidos o cápsulas.

10 Pueden obtenerse composiciones farmacéuticas para la administración oral combinando el principio activo con portadores sólidos, si se desea granular la mezcla resultante, y procesar la mezcla, si se desea o es necesario, tras la adición de los excipientes adecuados, en comprimidos, núcleos de grageas o cápsulas. Es también posible para ellos incorporar en portadores plásticos que permitan a los ingredientes activos difundirse o liberarse en cantidades medidas.

15 Las composiciones de la invención se pueden formular también como dispersiones sólidas. Las dispersiones sólidas so fases dispersas homogéneas extremadamente finas de dos o más sólidos. Las disoluciones sólidas (sistemas molecularmente dispersos), un tipo de dispersión sólida, son bien conocidas para el uso en tecnología farmacéutica (véase (Chiou y Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971)) y son útiles para aumentar las velocidades de disolución y aumentar la biodisponibilidad de los fármacos muy poco solubles en agua.

20 La presente invención proporciona también formas farmacéuticas sólidas que comprenden la disolución sólida descrita anteriormente. las formas farmacéuticas sólidas incluyen comprimidos, cápsulas y comprimidos masticables. Se pueden mezclar excipientes conocidos con la disolución sólida para proporcionar la forma farmacéutica deseada. Por ejemplo, una cápsula puede contener la disolución sólida mezclada con (a) un desintegrante y un lubricante, o (b) un desintegrante, un lubricante y un tensioactivo. un comprimido puede contener la disolución sólida mezclada con al menos un desintegrante, un lubricante, un tensioactivo, y un agente deslizante. El comprimido masticable puede contener la disolución sólida mezclada con un agente de volumen, un lubricante, y si se desea, un agente edulcorante adicional (tal como un edulcorante artificial), y aromas adecuados

25 Las formulaciones farmacéuticas pueden presentarse a un paciente en "envases para pacientes" que contienen un ciclo completo de tratamiento en un único envase, usualmente un envase de tipo blíster. Los envases para el paciente tienen una ventaja sobre las recetas tradicionales en que un farmacéutico divide el suministro de un paciente de un compuesto farmacéutico a partir de un suministro a granel, en que el paciente siempre puede consultar el prospecto incluido en el envase el envase para el paciente que ha desaparecido normalmente en las recetas para el paciente. La inclusión de un prospecto en el envase ha demostrado mejorar el cumplimiento terapéutico del paciente con las instrucciones del médico.

30 las composiciones para uso tópico incluyen pomadas, cremas, pulverizadores, parches, geles, gotas líquidas e inserciones (por ejemplo, inserciones intraoculares). Dichas composiciones pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos.

35 los ejemplos de formulaciones para la administración rectal o intravaginal incluyen pesarios y supositorios que pueden, por ejemplo, formarse a partir de un material conformado de forma moldeable o cerúlea que contiene el compuesto activo.

40 Las composiciones para la administración mediante inhalación pueden tomar la forma de composiciones de polvo inhalable o pulverizaciones líquidas o en polvo, y se pueden administrar en forma normalizada usando dispositivos inhaladores de polvo o dispositivos dispensadores en aerosol. Se conocen bien dichos dispositivos. Para la administración mediante inhalación, las formulaciones en polvo comprenden normalmente el compuesto activo junto con un diluyente en polvo sólido inerte tal como lactosa.

45 las composiciones presentarán generalmente una forma farmacéutica y, de este modo, contendrán normalmente compuesto suficiente para proporcionar un nivel deseado de actividad biológica. Por ejemplo, una formulación puede contener de 1 nanogramo a 2 gramos de principio activo, por ejemplo, de 1 nanogramo a 2 miligramos de principio activo. En este intervalo, los subintervalos particulares de compuesto son de 0,1 miligramos a 2 gramos de principio activo (más normalmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo, de 50 miligramos a 500 miligramos), o de 1 microgramos a 20 miligramos (por ejemplo, de 1 microgramo a 10 miligramos, por ejemplo, de 0,1 nanogramos a 2 miligramos de principio activo).

50 Para las composiciones orales, una forma farmacéutica puede contener de 1 miligramo a 2 gramos, más normalmente de 10 miligramos a 1 gramo, por ejemplo, de 50 miligramos a 1 gramo, por ejemplo, de 100 miligramos a 1 gramo, de compuesto activo.

55 El compuesto activo se administrará a un paciente que lo necesita (por ejemplo, un ser humano o un paciente animal) en una cantidad suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado.

Actividad inhibidora de la proteína quinasa

Se puede medir la actividad del compuesto de fórmula (I) como inhibidores de la proteína quinasa A y de la proteína quinasa B utilizando los ensayos que se muestran en los ejemplos siguientes y el nivel de actividad presentado por un compuesto dado se puede definir en términos del valor de la CI_{50} .

Usos terapéuticos**Prevención o tratamiento de los trastornos proliferativos**

El compuesto de la fórmula (I) es un inhibidor de la proteína quinasa A y de la proteína quinasa B. Como tal, será útil para proporcionar medios para evitar el crecimiento de o inducir la apoptosis de neoplasias. Las composiciones de la invención demostrarán por tanto ser útiles en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos tales como cánceres. En particular tumores con deleciones o mutaciones inactivantes en PTEN o pérdida de la expresión de PTEN o redistribuciones en el gen TCL-1 (linfocitos T) pueden ser particularmente sensibles a inhibidores de PKB. Los tumores que tienen otras anomalías que conducen a una señal de la ruta PKB regulada por exceso pueden ser también particularmente sensibles a los inhibidores de PKB. Los ejemplos de dichas anomalías incluyen, pero no se limitan a la expresión en exceso de una o más subunidades PI3K, la expresión en exceso de una o más isoformas de PKB, o mutaciones en PI3K, PDK1, o PKB que conduce a un aumento en la actividad basal de la enzima en cuestión, o la regulación por exceso o la expresión por exceso o la activación mutacional de un receptor del factor de crecimiento tal como un factor de crecimiento seleccionado entre las familias del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1R) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR).

Las composiciones de la invención serán también útiles, por ejemplo, en el tratamiento de otras dolencias que dan como resultado trastornos en la proliferación o supervivencia tales como infecciones víricas, e infecciones neurodegenerativas. PKB juega un importante papel en el mantenimiento de la supervivencia de células inmunes durante una respuesta inmune, y, por tanto, los inhibidores de PKB serían particularmente beneficiosos en trastornos inmunes que incluyen dolencias autoinmunes.

Por lo tanto, Los inhibidores de PKB podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades en las que existe un trastorno de proliferación, apoptosis o diferenciación.

Los inhibidores de PKB pueden ser también útiles en enfermedades resultantes de resistencia e insensibilidad a la insulina, y la perturbación de la glucosa, almacenamiento de energía y grasa tal como enfermedad metabólica y obesidad.

los ejemplos de cánceres que pueden inhibirse incluyen, pero no se limitan a, un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de la vejiga, de mama, colon (por ejemplo carcinomas colorrectales tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), de riñón, epidérmico, hígado, pulmón, por ejemplo, adenocarcinoma, cáncer de pulmón microcítico y carcinomas de pulmón no microcíticos, de esófago, vesícula biliar, de ovario, páncreas, por ejemplo, carcinoma de páncreas exocrino, estómago, cuello de útero, endometrio, tiroides, próstata, o piel, por ejemplo, carcinoma espinocelular; un tumor hematopoyético o linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos B, mieloma múltiple, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkitt; un tumor hematopoyético de linaje mieloide, por ejemplo, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, o leucemia promielocítica; síndrome mieloproliferativo; cáncer folicular de tiroides; un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo, fibrosarcoma o rhabdomyosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo, astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentoso; queratoacantoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi.

Por tanto, en las composiciones farmacéuticas, usos o métodos de la presente invención para tratar una enfermedad o dolencia que comprende crecimiento celular anómalo, la enfermedad o dolencia que comprende crecimiento celular anómalo en una realización es un cáncer.

Los sujetos concretos de cánceres incluyen el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer espinocelular y carcinomas de pulmón no microcíticos.

Un subconjunto adicional de cánceres incluye el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de endometrio y glioma.

Las composiciones de la invención se pueden usar en combinación con otros agentes anticancerosos. Se muestran a continuación ejemplos de dichas combinaciones.

Trastornos inmunes

los trastornos inmunes para los cuales las composiciones de la invención pueden ser beneficiosas incluyen, pero no se limitan a dolencias autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis autoinmune mediada, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus autoinmune, reacciones de hipersensibilidad con eccema, asma, EPOC, rinitis, y enfermedad del tracto respiratorio superior.

Otros usos terapéuticos

PKB juega un papel en la apoptosis, proliferación, diferenciación y por tanto, el compuesto de fórmula (I) podría ser también útil en el tratamiento de las siguientes enfermedades diferentes del cáncer y las asociadas con disfunción inmune; infecciones víricas, por ejemplo, virus del herpes, virus de la viruela, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis, adenovirus, VIH, VPH, VHC y HCMV; prevención del desarrollo del SIDA en individuos infectados por VIH; enfermedades cardiovasculares, por ejemplo hipertrofia cardíaca, restenosis, aterosclerosis; trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar; glomerulonefritis, síndromes mielodisplásicos, infartos de miocardio asociados a lesión isquémica, ictus y lesión por reperfusión, enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético, por ejemplo, osteoporosis y artritis, rinosinusitis sensible a aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades renales.

Usos asociados con o que surgen de la actividad inhibidora de la quinasa ROCK

Los compuestos de fórmula (I) modulan (por ejemplo, inhiben) la actividad de la quinasa ROCK. Los compuestos encuentran por tanto aplicación en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK; y/o (c) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la ruta de señalización de Rho; y/o (d) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la ruta de señalización de Rho.

la invención encuentra por tanto aplicación en relación a enfermedades y dolencias seleccionadas entre: (a) metástasis tumoral; (b) invasión tumoral; (c) progresión del tumor; (d) adhesión del tumor (por ejemplo, adhesión de células tumorales); (e) metástasis tumoral dependiente de contractilidad de la actinomicina, invasión o progresión, (f) transformación celular; (g) metástasis tumoral mediada por ROCK, invasión, progresión o adhesión; (h) metástasis tumoral dependiente de contractilidad de la actinomicina mediada por ROCK, invasión o progresión; (i) transformación celular mediada por ROCK.

La invención encuentra también aplicación en relación con el cáncer (por ejemplo, cáncer mediado por ROCK), especialmente en el que el cáncer (siendo por ejemplo un cáncer mediado por ROCK) se selecciona entre: (a) tumores de células germinales testiculares; (b) pequeños carcinomas de mama con capacidad metastásica; (c) cáncer de vejiga; (d) cáncer de ovario; (e) cáncer de próstata; y (f) carcinoma hepatocelular.

Otras enfermedades y dolencias aplicables incluyen la invasión, metástasis y progresión tumoral de cualquiera de los cánceres definidos en el presente documento.

La invención encuentra también aplicación en relación con enfermedades o dolencias, particularmente aquellas seleccionadas entre: (a) hipertensión; (b) disfunción cardíaca (por ejemplo, insuficiencia cardíaca crónica y congestiva); (c) hipertrofia cardíaca; (d) restenosis; (e) disfunción renal (por ejemplo, insuficiencia renal crónica); (f) aterosclerosis (arteriosclerosis); (g) cardioprotección; (h) supervivencia al aloinjerto; (i) isquemia cerebral; (j) vasoespasmo coronario y (k) inflamación vascular.

Otras enfermedades y dolencias aplicables incluyen disfunción muscular (por ejemplo, músculo liso), seleccionadas por ejemplo entre: (a) asma; (b) disfunción eréctil del pene; (c) disfunción sexual femenina; (d) síndrome I de vejiga hiperactiva; y (e) músculo liso anómalo (asociado por ejemplo con hipertensión):

Otras enfermedades y dolencias aplicables incluyen inflamación, donde por ejemplo, la inflamación comprende o se manifiesta por: (a) artritis reumatoide, (b) síndrome de intestino irritable; (c) enfermedad inflamatoria del intestino; (d) inflamación vascular, y (e) una enfermedad o dolencia neuroinflamatoria.

En realizaciones que se refieren a enfermedades o dolencias neuroinflamatorias, estas se pueden seleccionar entre: (a) ictus; (b) esclerosis múltiple; (c) enfermedad de Alzheimer; (d) enfermedad de Parkinson; (e) esclerosis lateral amiotrófica; y (f) dolor inflamatorio.

Otras enfermedades y dolencias aplicables incluyen enfermedades o dolencias del SNC, incluyendo aquellas seleccionadas entre:

(a) lesión o trauma de médula espinal; (b) lesión o trauma cerebral; (c) lesión neuronal aguda (por ejemplo, ictus o lesión cerebral traumática); (d) enfermedad de Parkinson; (e) enfermedad de Alzheimer; (f) dolencias o enfermedades neurodegenerativas; (g) ictus (asociado, por ejemplo, con hipertensión); (h) vasoespasmo cerebral; (i) inhibición del crecimiento de neuritas y de la aparición de brotes de neuritas; (j) regeneración de neuritas inhibida; (k) regeneración funcional post-traumática comprometida; (l) enfermedades o trastornos desmielinantes; (m) enfermedades o trastornos inflamatorios del SNC; (n) dolor neuropático; y (o) neurodegeneración.

Otras enfermedades o dolencias del SNC incluyen aquellas seleccionadas entre: Síndrome de Down y angiopatía β -amiloide tales como pero sin limitarse a angiopatía amiloide cerebral, hemorragia cerebral hereditaria, trastornos asociados con deterioro cognitivo, tales como, pero sin limitarse a MCI ("deterioro cognitivo leve"), enfermedad de Alzheimer, pérdida de memoria, síntomas por déficit de atención asociados con la enfermedad de Alzheimer, neurodegeneración asociada con enfermedades tales como enfermedad de Alzheimer o demencia que incluyen demencia de origen vascular y degenerativo mixto, demencia presenil, demencia senil y demencia asociada a la enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva o degeneración basal cortical, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal de tipo Parkinson, demencia compleja de Guam de tipo Parkinson, demencia por VIH, enfermedades con patologías asociadas a ovillos neurofibrilares, demencia pugilística, esclerosis lateral amiotrófica, degeneración corticobasal, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, parkinsonismo postencefálico, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick, ictus, traumatismo en la cabeza y otras enfermedades neurodegenerativas crónicas, enfermedad bipolar, trastornos afectivos, depresión, ansiedad, esquizofrenia, trastornos cognitivos; pérdida de cabello, medicación contraceptiva, estados de predemencia, deterioro de la memoria asociado a la edad, declive cognitivo relacionado con la edad, declive cognitivo sin demencia, declive cognitivo leve, declive neurocognitivo leve, olvidos al final de la vida, deterioro de memoria y deterioro cognitivo, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal y alopecia androgenética.

Otras enfermedades y dolencias adicionales aplicables incluyen: (a) resistencia a la insulina; (b) protección del injerto (por ejemplo, protección del injerto cardiovascular o inflamatoria); (c) diabetes; (d) asma; (e) vasoconstricción pulmonar; (f) glaucoma; y (g) fibrosis (por ejemplo, fibrosis hepática y fibrosis renal).

Otras enfermedades y dolencias aplicables incluyen enfermedades o dolencias infecciosas, que incluyen metazoarias protozoarias, fúngicas, priones, infestaciones víricas o bacterianas, enfermedades o infecciones.

En dichas realizaciones, la enfermedad o dolencia infecciosa puede comprender una redistribución citoesquelética mediada por patógenos.

Enfermedades proliferativas (incluyendo cánceres): La invención encuentra también aplicación como medio para evitar el crecimiento de o inducir la apoptosis de neoplasias. Se anticipa por tanto que la invención demostrará ser útil en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos tales como cánceres. Los ejemplos de dichas anomalías incluyen, pero no se limitan a la expresión en exceso de uno o más miembros de la ruta de señalización de Rho, o mutaciones en dichos miembros que conducen a un aumento en la actividad basal de la(s) quinasa(s) ROCK o la ruta de señalización de Rho (que puede por ejemplo asociarse con la regulación en exceso o la expresión en exceso o la activación mutacional de un receptor del factor de crecimiento tal como un factor de crecimiento seleccionado entre el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor del factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1R) y el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (familias de VEGFR).

Se prevé también que la invención será útil en el tratamiento de otras dolencias que son el resultado de trastornos en la proliferación o supervivencia tales como por ejemplo infecciones víricas, y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo.

la invención encuentra por tanto amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades en las que existe un trastorno de proliferación, apoptosis o diferenciación.

los ejemplos de cánceres que pueden inhibirse incluyen, pero no se limitan a, un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de la vejiga, de mama, colon (por ejemplo carcinomas colorrectales tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), de riñón, epidérmico, hígado, pulmón, por ejemplo, adenocarcinoma, cáncer de pulmón microcítico y carcinomas de pulmón no microcíticos, de esófago, vesícula biliar, de ovario, páncreas, por ejemplo, carcinoma de páncreas exocrino, estómago, cuello de útero, endometrio, tiroides, próstata, o piel, por ejemplo, carcinoma espinocelular; un tumor hematopoyético o linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkett; un tumor hematopoyético de linaje mielóide, por ejemplo, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, o leucemia promielocítica; cáncer folicular de tiroides; un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo, fibrosarcoma o rhabdomyosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo, astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentoso; queratoacantoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi.

Un ejemplo adicional de un tumor hematopoyético de linaje linfoide es el mieloma múltiple.

Los sujetos concretos de cánceres incluyen el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer espinocelular y carcinomas de pulmón no microcíticos. Un subconjunto adicional de cánceres incluye el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de endometrio y glioma.

5 Otro ejemplo de un trastorno de proliferación es el síndrome mieloproliferativo.

10 *Trastornos inmunes:* los trastornos inmunes para los cuales la invención puede ser beneficiosa incluyen, pero no se limitan a dolencias autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis autoinmune mediada, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus autoinmune, reacciones de hipersensibilidad con eccema, asma, EPOC, rinitis, y enfermedad del tracto respiratorio superior.

15 *Otros usos terapéuticos* Los procesos fisiológicos mediados por ROCK juegan un papel en la apoptosis, proliferación, diferenciación y por tanto, la invención podría ser también útil en el tratamiento de las siguientes enfermedades diferentes del cáncer y las asociadas con disfunción inmune; infecciones víricas, por ejemplo, virus del herpes, virus de la viruela, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis, adenovirus, VIH, VPH, VHC y HCMV; prevención del desarrollo del SIDA en individuos infectados por VIH; enfermedades cardiovasculares, por ejemplo hipertrofia cardíaca, restenosis, aterosclerosis; trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar; glomerulonefritis, síndromes mielodisplásicos, infartos de miocardio asociados a lesión isquémica, ictus y lesión por reperfusión, enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético, por ejemplo, osteoporosis y artritis, rinosinusitis sensible a aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades renales.

20 la invención puede ser también útil en enfermedades resultantes de resistencia e insensibilidad a la insulina, y la perturbación de la glucosa, almacenamiento de energía y grasa tal como enfermedad metabólica y obesidad.

25 La invención contempla la intervención, tratamiento o profilaxis de cualquier tipo mediada por ROCK. Por tanto, la invención encuentra aplicación en relación al tratamiento o profilaxis que comprende: (a) la modulación (por ejemplo, inhibición) de la quinasa ROCK; o (b) la intervención al nivel de la actividad de la quinasa ROCK; o (c) la intervención al nivel de la ruta de señalización de Rho (por ejemplo, al nivel de RhoA y/o RhoC).

30 Otros métodos aplicables incluyen intervenciones que afectan: (a) la relajación del músculo (por ejemplo, del músculo liso); (b) la relajación del músculo vascular (por ejemplo, para aumentar el flujo sanguíneo vascular); (c) la modulación de las células nerviosas; (d) la reducción de la proliferación celular; (e) la reducción de la migración celular; (f) la supresión de la redistribución citoesquelética tras la invasión o infección de patógenos; (g) la aceleración de la regeneración tisular; y (h) la potenciación de la recuperación funcional post-traumática.

35 En dichas realizaciones, la modulación de las células nerviosas puede comprender: (a) la regeneración neuronal; (b) una inducción del crecimiento axonal nuevo; (c) el recableado axonal a través de lesiones en el SNC; (d) la extensión del crecimiento de neuritas; (e) la diferenciación de neuritas; (f) la búsqueda de caminos de los axones, (g) la formación de la espina dendrítica; (h) el mantenimiento de la espina dendrítica; (i) la modulación del colapso del cono de crecimiento de neuritas; y (j) la modulación de la inhibición de la extensión del crecimiento de neuritas.

40 Otros tratamientos aplicables incluyen la terapia de trasplantes (que comprende por ejemplo la protección del injerto).

45 Otros métodos adicionales aplicables comprenden un método de diagnóstico y tratamiento de una patología o dolencia, cuyo método comprende: (i) seleccionar un paciente para determinar si el paciente está o puede estar padeciendo una enfermedad o dolencia que podría ser susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la quinasa ROCK; y (ii) cuando está indicado que la enfermedad o dolencia de la cual el paciente es de esta manera susceptible, administrar posteriormente al paciente un compuesto de acuerdo con la invención.

50 El sujeto o la población de pacientes puede seleccionarse a partir de: (a) aquellos en los que la quinasa ROCK es disfuncional (por ejemplo, hiperactiva); y (b) aquellos que se han sometidos a ensayos diagnósticos para la disfunción de ROCK (por ejemplo, para la hiperactividad de ROCK); (c) aquellos en los que la ruta de señalización de Rho es disfuncional; y (d) aquellos que se han sometido a los ensayos diagnósticos para la disfunción de la ruta de señalización de Rho.

Usos asociados con o que surgen de la actividad inhibidora de la quinasa p70S6K

60 Los compuestos de fórmula (I) modulan (por ejemplo, inhiben) la actividad de la proteína quinasa p70S6K. Los compuestos encuentran por tanto aplicación en: (a) el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o dolencia en la que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K; y/o (b) el tratamiento de un sujeto o población de pacientes en el que está indicada la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K.

65 La invención encuentra por tanto aplicación en relación a dolencias seleccionadas entre: (a) cáncer (por ejemplo,

cáncer mediado por p70S6K); (b) metástasis tumoral; (c) disfunción inmune; (d) daño al tejido (que surge por ejemplo de inflamación); (e) amplificación del cromosoma 17q23 (o dolencias que se derivan del anterior o están asociadas al anterior); (f) síndrome de Peutz-Jeghers (o dolencias que se derivan del anterior o están asociadas al anterior); (g) mutación(es) de LKB1 (o dolencias que se derivan del anterior o están asociadas al anterior); (g) mutación(es) de BRCA1 (o dolencias que se derivan del anterior o están asociadas al anterior); (i) mutación(es) de BRCA2 (o dolencias que se derivan del anterior o están asociadas al anterior); (j) programas apoptóticos disfuncionales; (k) transducción de la señal del receptor del factor de crecimiento, la expresión en exceso y la activación en tejidos tumorales; (1) una enfermedad o trastorno metabólico; (m) aquellos asociados con la proliferación y/o el metabolismo celular anormal; y (n) trastornos neuronales.

En dichas realizaciones, la enfermedad o dolencia que se deriva o está asociada con la amplificación del cromosoma 17q23 puede seleccionarse entre: (a) tumores de mama primarios; (b) tumores (por ejemplo, tumores de mama) que contienen mutaciones de BRCA2; (c) tumores (por ejemplo, tumores de mama) que contienen mutaciones de BRCA1; (d) tumores de páncreas; (e) tumores de vejiga; y (f) neuroblastomas.

La enfermedad o dolencia que se deriva o está asociada con mutación(es) de LKB1 puede ser adenocarcinoma de pulmón que contiene mutación(es) de LKB1 (por ejemplo inactivación de mutación(es) de LKB1).

La enfermedad o dolencia que se deriva o está asociada con mutación(es) de BRCA1/2 puede ser cáncer de mama.

La enfermedad o trastorno metabólico puede seleccionarse entre: (a) obesidad (por ejemplo, obesidad inducida por la edad u obesidad inducida por la dieta); (b) diabetes; (c) síndrome metabólico; (d) resistencia a la insulina; (e) hiperglicemia; (f) hiperaminoacidemia; e (g) hiperlipidemia.

Enfermedades proliferativas (incluyendo cánceres): La invención encuentra también aplicación como medio para evitar el crecimiento de o inducir la apoptosis de neoplasias. Se anticipa por tanto que la invención demostrará ser útil en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos tales como cánceres. Los ejemplos de dichas anomalías incluyen, pero no se limitan a la expresión en exceso de p70S6K (o los otros síndromes descritos en el presente documento).

Se prevé también que la invención será útil en el tratamiento de otras dolencias que son el resultado de trastornos en la proliferación o supervivencia tales como por ejemplo infecciones víricas, y enfermedades neurodegenerativas, por ejemplo.

la invención encuentra por tanto amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades en las que existe un trastorno de proliferación, apoptosis o diferenciación.

los ejemplos de cánceres que pueden inhibirse incluyen, pero no se limitan a, un carcinoma, por ejemplo un carcinoma de la vejiga, de mama, colon (por ejemplo carcinomas colorrectales tales como adenocarcinoma de colon y adenoma de colon), de riñón, epidérmico, hígado, pulmón, por ejemplo, adenocarcinoma, cáncer de pulmón microcítico y carcinomas de pulmón no microcíticos, de esófago, vesícula biliar, de ovario, páncreas, por ejemplo, carcinoma de páncreas exocrino, estómago, cuello de útero, endometrio, tiroides, próstata, o piel, por ejemplo, carcinoma espinocelular; un tumor hematopoyético o linaje linfoide, por ejemplo, leucemia, leucemia linfocítica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma de células pilosas, o linfoma de Burkitt; un tumor hematopoyético de linaje mielóide, por ejemplo, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico, o leucemia promielocítica; cáncer folicular de tiroides; un tumor de origen mesenquimal, por ejemplo, fibrosarcoma o rhabdomyosarcoma; un tumor del sistema nervioso central o periférico, por ejemplo, astrocitoma, neuroblastoma, glioma o schwannoma; melanoma; seminoma; teratocarcinoma; osteosarcoma; xeroderma pigmentoso; queratoacantoma; cáncer folicular de tiroides; o sarcoma de Kaposi.

Un ejemplo adicional de un tumor hematopoyético de linaje linfoide es el mieloma múltiple.

Los sujetos concretos de cánceres incluyen el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer espinocelular y carcinomas de pulmón no microcíticos. Un subconjunto adicional de cánceres incluye el cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de endometrio y glioma. Otro ejemplo de un trastorno de proliferación es el síndrome mieloproliferativo.

Trastornos inmunes: los trastornos inmunes para los cuales la invención puede ser beneficiosa incluyen, pero no se limitan a dolencias autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas, por ejemplo, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis autoinmune mediada, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus autoinmune, reacciones de hipersensibilidad con eccema, asma, EPOC, rinitis, y enfermedad del tracto respiratorio superior.

otros usos terapéuticos: los procesos fisiológicos mediados por p70S6K pueden jugar un papel en la apoptosis, proliferación, diferenciación y por tanto, la invención podría ser también útil en el tratamiento de las siguientes enfermedades diferentes del cáncer y las asociadas con disfunción inmune; infecciones víricas, por ejemplo, virus del

herpes, virus de la viruela, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis, adenovirus, VIH, VPH, VHC y HCMV; prevención del desarrollo del SIDA en individuos infectados por VIH; enfermedades cardiovasculares, por ejemplo hipertrofia cardiaca, restenosis, aterosclerosis; trastornos neurodegenerativos, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar; glomerulonefritis, síndromes mielodisplásicos, infartos de miocardio asociados a lesión isquémica, ictus y lesión por reperfusión, enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético, por ejemplo, osteoporosis y artritis, rinosinusitis sensible a aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades renales.

la invención puede ser también útil en enfermedades resultantes de resistencia e insensibilidad a la insulina, y la perturbación de la glucosa, almacenamiento de energía y grasa tal como enfermedad metabólica y obesidad.

La invención contempla la intervención mediada por la proteína quinasa p70S6K, tratamiento o profilaxis de cualquier tipo. Por tanto, la invención encuentra aplicación en relación al tratamiento o profilaxis que comprende: (a) la modulación (por ejemplo, inhibición) de la proteína quinasa p70S6K; (b) la intervención al nivel de la actividad de la proteína quinasa p70S6K; (c) inhibición de la progresión desde la fase G1 a la fase S en el ciclo celular *in vivo*; (d) inhibición de la proliferación del ciclo celular en la fase G1 a la fase S del ciclo celular; (e) uso de un compuesto de fórmula (I) como un derivado de rapamicina; (f) uso de un compuesto de fórmula (I) como un derivado de wortmannina; (g) el restablecimiento de programas apoptóticos adecuados; (h) la inhibición de la transducción de la señal del receptor del factor de crecimiento, la expresión en exceso y la activación en tejidos tumorales; (i) modulación de la diferenciación de células neuronales; (j) modulación de la motilidad celular; (k) modulación de la(s) respuesta(s) celular(es); y (l) potenciación de la sensibilidad a la insulina.

El tratamiento o la profilaxis puede comprender también un método de diagnóstico y tratamiento de una patología o dolencia, cuyo método comprende: (i) seleccionar un paciente para determinar si el paciente está o puede estar padeciendo una enfermedad o dolencia que podría ser susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene actividad frente a la proteína quinasa p70S6K; y (ii) cuando está indicado que la enfermedad o dolencia de la cual el paciente es de esta manera susceptible, administrar posteriormente al paciente un compuesto de fórmula (I) tal como se ha definido en el presente documento.

El sujeto o la población de pacientes puede seleccionarse a partir de: (a) aquellos en los que la proteína quinasa p70S6K es disfuncional (por ejemplo, hiperactiva); (b) aquellos que se han sometido a ensayos diagnósticos para la disfunción de p70S6K (por ejemplo, para la hiperactividad de p70S6K); (c) aquellos en los que el cromosoma 17q23 está amplificado; y (d) aquellos que se han sometido a ensayos diagnósticos para la amplificación del cromosoma 17q23; (e) aquellos en los que están presentes la(s) mutación(es) de BRCA1; (f) aquellos que se han sometido a ensayos diagnósticos para la(s) mutación(es) de BRCA1; (g) aquellos en los que están presentes la(s) mutación(es) de BRCA2; (h) aquellos que se han sometido a ensayos diagnósticos para la(s) mutación(es) de BRCA2; (i) aquellos en los que están presentes la(s) mutación(es) de LKB1; (j) aquellos que se han sometido a ensayos diagnósticos para la(s) mutación(es) de LKB1; y (k) aquellos que se han seleccionado tal como se ha definido en el presente documento.

Ventajas de las composiciones de la invención

Potencialmente, las composiciones de la invención tienen propiedades fisicoquímicas adecuadas para la exposición oral.

la composición tal como se define en el presente documento debe presentar biodisponibilidad oral mejorada para los compuestos de la técnica anterior. Se puede definir la biodisponibilidad oral como la relación (F) de la exposición a plasma de un compuesto cuando se dosifica mediante la ruta oral a la exposición a plasma del compuesto cuando se dosifica mediante la ruta intravenosa (i.v.), expresada como un porcentaje.

Las composiciones que tienen una biodisponibilidad oral (valor F) de más de un 30%, de forma más preferente de más de un 40%, son particularmente ventajosas porque pueden administrarse por vía oral más bien que, o así como, mediante administración parenteral.

Además, el compuesto de fórmula (I) es más potente y más selectivo en sus actividades frente a las diferentes quinasas, y demuestra selectividad potenciada para y potencia frente a PKB en particular.

El compuesto de fórmula (I) es significativamente más potente que su enantiómero R en la inhibición de PKB *in vitro* y en células. La CI_{50} para el compuesto de fórmula (I) frente a la enzima PKB aislada en un ensayo radiométrico *in vitro* es de 0,01 μM en comparación con 0,96 μM para el enantiómero R. Esta diferencia aproximada de 100 veces en la potencia se observó también en un ensayo mecanístico basado en células que mide la fosforilación de GSK3 β , un sustrato corriente abajo directo de PKB. El compuesto de fórmula (I) muestra una CI_{50} de 1,1 μM , en comparación con un valor para el enantiómero R de >50 μM .

Una diferencia adicional entre los 2 enantiómeros es en su potencia frente a la quinasa PKA estrechamente relacionada, en la que el compuesto de fórmula (I) inhibe la enzima aislada en un 44% a 0,03 μM en comparación con

el enantiómero R que inhibe PKA a 0,25 µM.

5 El compuesto de fórmula (I) es ventajoso sobre los compuestos de la técnica anterior en que tiene susceptibilidades diferentes a las enzimas P450 y en que presenta mejoras con respecto al metabolismo del fármaco y a las propiedades farmacocinéticas. Por ejemplo, el compuesto de fórmula (I) tiene valores de CI_{50} de más de 10 µM frente a cada una de las enzimas 1A2 del citocromo P450, 2C9, 2C19, 3A4 y 2D6.

Además, el compuesto de fórmula (I) debe presentar requerimientos de dosificación reducidos.

10 El compuesto de fórmula (I) es potencialmente menos tóxico que los compuestos de la técnica anterior.

hERG

15 A finales de la década de los 90 del siglo pasado, numerosos fármacos, homologados por la US FDA, se han retirado de la venta en los Estados Unidos cuando se ha descubierto que estaban implicados en muertes producidas por disfunción cardíaca. Se ha encontrado un efecto secundario de estos fármacos ha sido el desarrollo de arritmias producidas por el bloqueo de los canales de hERG en células de corazón. El canal hERG es uno de una familia de canales del ion potasio en la que el primer miembro de la cual se ha identificado en los últimos años de la década de los 80 del siglo XX en un mutante de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (véase Jan, L.Y. y Jan, Y.N. (1990). A Superfamily of Ion Channels. Nature, 345(6277):672). Las propiedades biofísicas del canal de iones potasio hERG se describen en Sanguinetti, M.C., Jiang, C. Curran, M.E., y Keating, M.T. (1995). A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the 1kr potassium channel. Cell, 81:299-307, y Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B., y Robertson, G.A. (1995). HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. Science, 269:92-95.

25 La eliminación de la actividad de bloqueo de hERG sigue siendo una importante consideración en el desarrollo de cualquier fármaco nuevo.

Los compuestos de fórmula (I) tienen una actividad bloqueante del canal de iones hERG despreciable.

30

Métodos de tratamiento

35 La composición tal como se define en el presente documento será útil en la profilaxis o el tratamiento de una gama de patologías o dolencias mediadas por la proteína quinasa A y/o la proteína quinasa B y/o una quinasa ROCK y/o la quinasa p70S6K. Los ejemplos de dichas patologías y dolencias se han mostrado anteriormente.

Las composiciones se administran generalmente a un sujeto que necesita de dicha administración, por ejemplo, un paciente humano o animal, preferentemente un ser humano.

40 la composición se administrará normalmente en cantidades que son terapéutica o profilácticamente útiles y que generalmente no son tóxicas. Sin embargo, en determinadas situaciones (por ejemplo, en el caso de enfermedades que suponen una amenaza para la vida), los beneficios de administrar una composición tal como se define en el presente documento pueden pesar más que las desventajas de algunos efectos tóxicos o efectos secundarios, en cuyo caso puede considerarse deseable administrar compuestos en cantidades que se asocian con un grado de toxicidad.

45

Las composiciones pueden administrarse durante un término prolongado para mantener efectos terapéuticos beneficiosos o se pueden administrar solo durante un corto periodo de tiempo. Alternativamente se pueden administrar de una manera a pulsos o continua.

50

Una dosis diaria típica del compuesto de fórmula (I) puede estar en el intervalo de 100 picogramos a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal, más normalmente 5 nanogramos a 25 miligramos por kilogramo de peso corporal, y más normalmente 10 nanogramos a 15 miligramos por kilogramo (por ejemplo, 10 nanogramos a 10 miligramos, y más normalmente 1 microgramo por kilogramo a 20 miligramos por kilogramo, por ejemplo 1 microgramo a 10 miligramos por kilogramo) por kilogramo de peso corporal aunque se pueden administrar dosis mayores o menores cuando se requiere. la composición tal como se define en el presente documento se puede administrar sobre una base diaria o sobre una base de repetición cada 2, o 3, o 4, o 5, o 6, o 7, o 10 o 14, o 21, o 28 días por ejemplo.

55

60 El compuesto de fórmula (I) puede administrarse por vía oral en un intervalo de dosis, por ejemplo, 1 a 1500 mg, 2 a 800 mg, o 5 a 500 mg, por ejemplo, 2 a 200 mg o 10 a 1000 mg, los ejemplos particulares de dosis incluyen 10, 20, 50 y 80 mg. El compuesto se puede administrar una vez o más de una vez cada día. El compuesto se puede administrar de forma continua (es decir, tomarse cada día sin romper la duración del régimen de tratamiento). Como alternativa, el compuesto se puede administrar intermitentemente, es decir, tomarse continuamente durante un periodo dado tal como una semana, a continuación suspenderse durante un periodo tal como una semana y a continuación tomarse continuamente durante otro periodo tal como una semana y de esta manera a lo largo de la duración del régimen de tratamiento. Los ejemplos de regímenes de tratamiento que implican la administración intermitente incluyen regímenes

65

donde la administración es en ciclos de una semana de toma, una semana de suspensión; o dos semanas de toma, una semana de suspensión; o tres semanas de toma, una semana de suspensión; o dos semanas de toma, dos semanas de suspensión; o cuatro semanas de toma dos semanas de suspensión; o una semana de toma tres semanas de suspensión - para uno o más ciclos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 más ciclos.

en un calendario de dosificación concreto, se administrará a un paciente una infusión de una composición tal como se define en el presente documento durante periodos de una hora diaria durante hasta diez días en concreto hasta cinco días durante una semana, y se repitió el tratamiento en un intervalo deseado tal como dos a cuatro semanas, en particular cada tres semanas.

Más particularmente, se puede administrar a un paciente una infusión de una composición tal como se define en el presente documento durante periodos de una hora diaria durante 5 días y se repitió el tratamiento cada tres semanas.

En otro calendario de dosificación concreto, se administra a un paciente una infusión durante 30 minutos a 1 hora seguido por infusiones de mantenimiento de duración variable, por ejemplo, 1 a 5 horas, por ejemplo, 3 horas.

En otro calendario de dosificación concreto, se administra a un paciente una infusión continua durante un periodo de 12 horas a 5 días, y en particular una infusión continua de 24 horas a 72 horas.

Finalmente, sin embargo, la cantidad del compuesto administrado y el tipo de composición usada estará acorde con la naturaleza de la enfermedad o la dolencia fisiológica que se está tratando y será al criterio del médico.

El compuesto de fórmula (I) se puede administrar como el único agente terapéutico o se puede administrar en un tratamiento combinado con uno o más compuestos diferentes para el tratamiento de una patología concreta, por ejemplo una enfermedad neoplásica tal como un cáncer que se ha definido anteriormente en el presente documento. Los ejemplos de otros agentes o tratamientos terapéuticos que se pueden administrar juntos (tanto de forma simultánea como en diferentes intervalos de tiempo) con los compuestos de la fórmula (I) incluyen, pero no se limitan a:

- Inhibidores de la Topoisomerasa I
- Antimetabolitos
- Agentes que hacen diana en la tubulina
- Aglutinante del ADN e inhibidores de la topoisomerasa II
- Agentes alquilantes
- Anticuerpos monoclonales.
- Anti-Hormonas
- Inhibidores de la transducción de la señal
- Inhibidores del proteosoma
- ADN metil transferasas
- Citoquinas y retinoides
- Tratamientos dirigidos contra la cromatina
- Radioterapia, y,
- Otros agentes terapéuticos o profilácticos; por ejemplo, agentes que reducen o alivian algunos de los efectos secundarios asociados con la quimioterapia. Los ejemplos concretos de dichos agentes incluyen agentes antieméticos y agentes que evitan o disminuyen la duración de la neutropenia asociada a quimioterapia y evitan las complicaciones que surgen de niveles reducidos de glóbulos rojos o glóbulos blancos, por ejemplo eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), y factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). se incluyen también agentes que inhiben la resorción ósea tal como agentes de bisfosfonato, por ejemplo, zoledronato, pamidronato e ibandronato, agentes que suprimen las respuestas inflamatorias (tales como dexametasona, prednisona, y prednisolona) y agentes utilizados para reducir niveles en sangre de hormona del crecimiento e IGF-I en pacientes con acromegalia tales como formas sintéticas de la hormona del cerebro somatostatina, que incluye acetato de octeotido que es un octapéptido de acción duradera con propiedades farmacológicas que imitan aquellas de la hormona natural somatostatina. Están incluidos además agentes tales como leucovorina, que se usan como un antídoto de fármacos que disminuyen los niveles de ácido fólico, o el propio ácido folínico y agentes tales como acetato de megesterol, que se pueden usar para el tratamiento de los efectos secundarios que incluyen edema y episodios trombóticos.

Cada uno de los compuestos presentes en las combinaciones de la invención pueden administrarse en calendarios de dosis que varían individualmente y mediante diferentes rutas.

En el que el compuesto de fórmula (I) se administra en un tratamiento combinado con uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos (preferentemente uno o dos, más preferentemente uno), Los compuestos se pueden administrar de forma simultánea o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, se pueden administrar en intervalos estrechamente separados (por ejemplo, durante un periodo de 5-10 minutos) o a intervalos más largos (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más horas de separación, o incluso periodos más largos de separación cuando se requiere), el régimen de dosificación preciso debe ser acorde con las propiedades del(de los) agente(s) terapéutico(s).

El compuesto de fórmula (I) puede administrarse también junto con tratamientos no quimioterapéuticos tales como radioterapia, terapia fotodinámica, terapia génica; cirugía y dietas controladas.

5 Para uso en tratamiento combinado con otro agente quimioterapéutico, la composición que se define en el presente documento y uno, dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos pueden ser, por ejemplo, formuladas juntas en una forma de dosificación que contiene dos, tres, cuatro o más agentes terapéuticos. En una forma alternativa, los agentes terapéuticos individuales pueden formularse por separado y presentarse juntos en la forma de un kit, opcionalmente con instrucciones para su uso.

10 Una persona experta en la materia conocería a través del conocimiento general los regímenes de dosificación y los tratamientos combinados que usar.

Métodos de diagnóstico

15 Antes de administrar una composición como se define en el presente documento, se debe cribar un paciente para determinar si la enfermedad o dolencia que el paciente padece o puede padecer sería susceptible al tratamiento con un compuesto que tiene una actividad contra una diana quinasa concreta (por ejemplo, proteína quinasa A y/o proteína quinasa B y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K).

20 Por ejemplo, una muestra biológica tomada de un paciente se puede analizar para determinar si una enfermedad o dolencia, tales como cáncer, que el paciente padece o puede padecer es una que se caracteriza por una anomalía genética o una expresión de proteína anómala que conduce a la sobreexpresión de PKA y/o PKB o a la sensibilización de una ruta hacia la actividad normal de PKA y/o PKB, o a una sobreexpresión de un componente de transducción de la señal anterior a PKA y/o PKB tal como, en el caso de PKB, P13K, receptor GF y PDK 1 y 2.

25 Como alternativa, una muestra biológica tomada de un paciente se puede analizar para determinar la pérdida de un regulador negativo o supresor de la ruta de PKB tal como PTEN. En el contexto presente, el término "pérdida" abarca la delección de un gen que codifica el regulador o supresor, el truncamiento del gen (por ejemplo, por mutación), el truncamiento del producto transcrito del gen, o la inactivación del producto transcrito (por ejemplo, por mutación puntual) o secuestro por otro producto génico.

30 Como alternativa, o adicionalmente, el paciente se puede cribar para determinar una disfunción en la actividad de ROCK (por ejemplo, una expresión elevada o regulada por exceso de ROCK, mutaciones en genes ROCK o elementos reguladores del gen ROCK) o una disfunción en la señalización de Rho (como se describe en el presente documento).

35 El término regulación por exceso incluye la expresión elevada o la sobreexpresión, incluyendo la amplificación génica (es decir, múltiples copias del gen) y aumento en la expresión por un efecto de la transcripción, e hiperactividad y activación, incluyendo activación por mutaciones. Por tanto, el paciente se puede someter a una prueba diagnóstica para detectar un marcador característico de la regulación por exceso de una quinasa (por ejemplo PKA y/o PKB y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K). El término diagnóstico incluye el cribado. Por marcador, los autores incluyen los marcadores genéticos entre los que se incluyen, por ejemplo, la medida de la composición del ADN para identificar mutaciones de la quinasa (por ejemplo PKA y/o PKB y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K). El término marcador también incluye marcadores que son característicos de una regulación por exceso de la quinasa (por ejemplo PKA y/o PKB y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K) y/u otros factores que conducen a la regulación por exceso de las rutas relevantes, incluyendo la actividad enzimática, niveles de enzima, estado de la enzima (por ejemplo, si está fosforilada o no) y los niveles de ARNm de las proteínas anteriormente mencionadas.

50 Las pruebas y cribados diagnósticos anteriores se llevan a cabo de forma típica en una muestra biológica seleccionada entre muestras de biopsia tumoral, muestras de sangre (aislamiento y enriquecimiento de células tumorales diseminadas), biopsias de deposiciones, esputo, análisis de cromosomas, fluido pleural, fluido peritoneal, médula ósea u orina.

55 La identificación de un individuo que tiene una mutación en PKA y/o PKB o una reordenación de TCL-1 o pérdida de la expresión de PTEN puede significar que el paciente sería especialmente adecuado para el tratamiento con un inhibidor de PKA y/o PKB. Los tumores se pueden cribar preferentemente para determinar la presencia de una variante de PKA y/o PKB antes del tratamiento. El proceso de cribado implicará de forma típica la secuenciación directa, el análisis de micromatrices de oligonucleótidos, o un anticuerpo específico del mutante.

60 Los métodos de identificación y análisis de mutaciones y la regulación por exceso de las proteínas son temas conocidos del experto en materia. Los de cribado pueden incluir, pero no se limitan a, métodos convencionales tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) o hibridación in situ.

65 En el cribado mediante RT-PCR, el nivel de ARNm del tumor se evalúa creando una copia de ADNc del ARNm seguido de la amplificación del ADNc mediante PCR. Los métodos de amplificación por PCR, la selección de cebadores, y las condiciones de amplificación, son conocidas del experto en la materia. Las manipulaciones de ácido nucleico y la PCR

se llevan a cabo con métodos convencionales, tal como se describe por ejemplo en Ausubel, F.M. y col., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc., o Innis, M.A. y col., eds. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 1990, Academic Press, San Diego. Las reacciones y manipulaciones que implican técnicas de ácidos nucleicos también se describen en Sambrook y col., 2001, 3ª Ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Como alternativa, se puede utilizar un kit comercialmente disponible para la RT-PCR (por ejemplo Roche Molecular Biochemicals), o la metodología definida en las patentes de los Estados Unidos 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659, 5.272.057, 5.882.864, y 6.218.529 incorporadas en el presente documento por referencia.

Un ejemplo de una técnica de hibridación in situ para evaluar la expresión de ARNm sería la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) (véase Angerer, 1987 *Meth. Enzymol.* 152: 649).

En general, la hibridación in situ comprende las siguientes etapas principales: (1) fijación del tejido a analizar; (2) tratamiento de prehibridación de la muestra para aumentar la accesibilidad del ácido nucleico diana, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos con el ácido nucleico de la estructura biológica del tejido; (4) lavados posteriores a la hibridación para eliminar los fragmentos de ácido nucleico no unidos durante la hibridación, y (5) detección de los fragmentos de ácido nucleico hibridado. Las sondas utilizadas en dichas aplicaciones están habitualmente marcadas, por ejemplo, con radioisótopos o indicadores fluorescentes. Las sondas preferidas tienen longitud suficientemente, por ejemplo, de aproximadamente 50, 100, o 200 nucleótidos a aproximadamente 1000 o más nucleótidos, para permitir la hibridación específica con el ácido nucleico o ácidos nucleicos diana en condiciones rigurosas. Los métodos convencionales para llevar a cabo FISH se describen en Ausubel, F.M. y col., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc y en *Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview* de John M. S. Bartlett en *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols*, 2ª ed.; ISBN: 1-59259-760-2; 2004 de marzo de págs. 077-088; Serie: *Methods in Molecular Medicine*.

Como alternativa, los productos de proteína expresados a partir del ARNm se pueden ensayar mediante inmunohistoquímica de las muestras tumorales, inmunoensayo en fase sólida con placas de microvaloración, Transferencia Western, electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida SDS, ELISA, citometría de flujo y otros métodos conocidos en la materia para la detección de proteínas específicas. Los métodos de detección incluirían el uso de anticuerpos específicos. El técnico experto reconocerá que todas estas técnicas bien conocidas para la detección de la regulación por exceso de la quinasa (por ejemplo PKA y/o PKB y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K), o la detección de variantes de la quinasa se podrían aplicar al presente caso.

Por tanto, todas estas técnicas se podrían también utilizar para identificar tumores especialmente adecuados para el tratamiento con inhibidores de PKA y/o PKB y/o quinasa ROCK y/o quinasa P70S6K.

Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, se ha descubierto que PKB beta está regulado por exceso en 10-40% de los cánceres ováricos y pancreáticos (Bellacosa y col. 1995, *Int. J. Cancer* 64, 280 - 285; Cheng y col. 1996, *PNAS* 93, 3636-3641; Yuan y col 2000, *Oncogene* 19, 2324 - 2330). Por tanto, se prevé que los inhibidores de PKB, y en particular los inhibidores de PKB beta, se puede usar para tratar cánceres ováricos y pancreáticos.

PKB alfa está amplificado en cáncer gástrico, de próstata y de mama humano, (Staal 1987, *PNAS* 84, 5034 - 5037; Sun y col 2001, *Am. J. Pathol.* 159, 431 -437). Por tanto, se prevé que los inhibidores de PKB, y en particular los inhibidores de PKB alfa, se pueden utilizar para tratar el cáncer gástrico, de próstata y de mama humanos.

Se ha observado un aumento en la actividad de PKB gamma en líneas celulares de mama y de próstata independientes de esteroides (Nakatani y col. 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 21528 - 21532). Por tanto, se prevé que los inhibidores de PKB, y en particular los inhibidores de PKB gamma, se puedan utilizar para tratar cánceres de mama y de próstata independientes de esteroides.

La detección de ROCK se puede llevar a cabo tanto en el ARNm como en la proteína. Los ejemplos específicos de los métodos en los que se han determinado los niveles de Rho y ROCK en muestras clínicas incluyen:

- *American Journal of Pathology.* 2002;160:579-584. Este artículo describe la inmunohistoquímica realizada sobre tejidos fijados con formalina para caracterizar la expresión de RhoC en tejidos de mama humana.
- *Clinical Cancer Research* Vol. 9, 2632-2641, julio de 2003. Este artículo describe el uso de transferencias Western para cualificar la expresión de Rho y ROCK en muestras quirúrgicas emparejadas tumorales y no tumorales procedentes de 107 pacientes japoneses consecutivos con cáncer de vejiga.
- *Pancreas.* 24(3):251-257, abril de 2002. Este artículo describe la expresión de ROCK-1 en tejidos pancreáticos humanos mediante inmunotransferencia e inmunohistoquímica.
- *World J Gastroenterol* 2003 September;9(9):1950-1953. Este artículo describe el examen de los niveles de expresión de ARNm del gen RhoC mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) en el carcinoma hepatocelular (HCC).

La descripción metodológica relevante relativa a la cuantificación de los niveles de actividad o expresión de Rho y/o ROCK en las publicaciones anteriormente mencionadas se incorpora en el presente documento por referencia.

5 La detección de p70S6K se puede llevar a cabo tanto en el ARNm como en la proteína. Los métodos ilustrativos se describen, por ejemplo, en J Naltl Cancer Inst (2000): 92, pp. 1252-9 (que describe la detección de la activación de la quinasa de la proteína ribosómica S6 mediante el ADN complementario y el análisis del tejido mediante micromatriz utiliza hibridación genómica comparativa (CGH) y ADNc y el análisis del tejido mediante micromatriz para identificar los genes amplificados y).

10 La detección de p70S6K sobreexpresado se describe en Int J Oncol (2004): 24 (4), pp. 893-900. Este artículo describe el perfilado farmacogenómico de la ruta PI3K/PTEN-Akt-mTOR en tumores humanos comunes usando inmunohistoquímica para comparar la expresión elevada de p70S6K, AKT con la sensibilidad tumoral.

PARTE EXPERIMENTAL

15 La invención se ilustrará ahora, pero sin limitación, por referencia a las realizaciones específicas descritas en los procedimientos y ejemplos siguientes.

20 Los materiales de partida para cada uno de los procedimientos descritos a continuación están comercialmente disponibles salvo que se indique otra cosa.

25 Los espectros de resonancia magnética de protón (RMN ¹H) se registraron en un instrumento Bruker AV400 que operaba a 400,13 MHz, en Me- α ³/₄-OD a 27 °C, salvo que se indique otra cosa y se notifica de la siguiente forma: desplazamiento químico δ /ppm (número de protones, multiplicidad donde s=singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuartete, m = multiplete br=amplio). El disolvente prótico residual MeOH = 3,31 ppm) se utilizó como referencia interna.

30 En los ejemplos, los compuestos preparados se caracterizaron mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas con los sistemas y condiciones operativas definidas a continuación. Cuando está presente cloro, la masa citada del compuesto se refiera a ³⁵Cl. Las condiciones operativas utilizadas se describen a continuación.

Plataforma y sistema

Sistema HPLC:	Waters 2795
Detector	de
espectrometría	de
masas:	Micromass Platform LC
Detector PDA:	Waters 2996 PDA

35 **Condiciones analíticas ácidas 2:**

Eluyente H₂O (ácido fórmico al 0,1%)
 A:
 Eluyente
 B: CH₃CN (ácido fórmico al 0,1%)
 Gradiente: Eluyente B 5-95% durante 3,5 minutos
 Caudal: 0,8 ml/min
 Columna: Phenomenex Synergi 4 μ Max-RP 80A, 50 x 2,0 mm

40 **Condiciones analíticas básicas 5:**

Eluyente H₂O (tampón NH₄HCO₃ 10 mM ajustado a pH=9,2 con NH₄OH)
 A:
 Eluyente CH₃CN
 B:
 Gradiente: Eluyente B 05-95% durante 3,5 minutos
 Caudal: 0,8 ml/min
 Columna: Phenomenex Gemini 5 μ 2.0 x 50 mm

Condiciones de MS:

Voltaje capilar: 3,5 kV o 3,6 kV

Voltaje de cono: 30 V
 Temperatura de la fuente: 120 °C
 Intervalo de barrido: 165-700 amu
 Modo de ionización: Electropulverización negativo, positivo o positivo y negativo

En los ejemplos siguientes, se utiliza la siguiente clave para identificar las condiciones LCMS utilizadas:

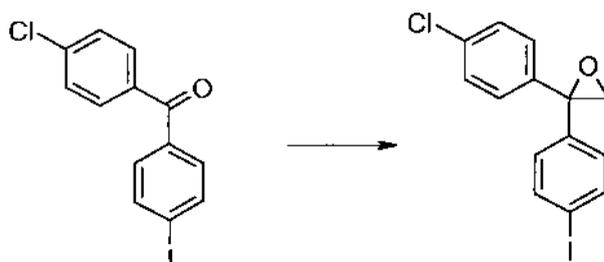
	Plataforma y sistema - condiciones analíticas ácidas
PS-A2	2
PS-B5	Plataforma y sistema - condiciones analíticas básicas
	5

5 EJEMPLO 1

Preparación de (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol

1 A. 2-(4-cloro-fenil)-2-(4-yodo-fenil)-oxirano

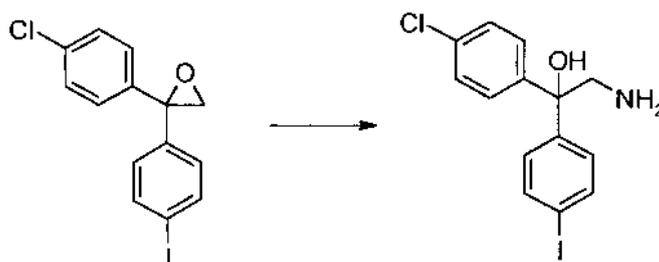
10



Hidruro de sodio (dispersión al 60% en aceite, 128 mg, 3,2 mmol) se puso bajo atmósfera de N_2 y a continuación se añadió DMSO (5 ml). Yoduro de trimetilsulfonio (0,66 g, 3,2 mmol) se añadió en porciones durante 15 minutos, seguido después de 30 minutos más por (4-clorofenil)-(4-yodo-fenil)-metanona (1 g, 2,9 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas y a continuación se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua/salmuera 1:2, agua y salmuera (x2). La fase orgánica se secó ($MgSO_4$), se filtró y se concentró para obtener el compuesto del título (1,01 g, 97%), que se usó sin purificación adicional. LCMS (PS-A2) R_t 4,07 min $[M-H]^-$ 355.

15

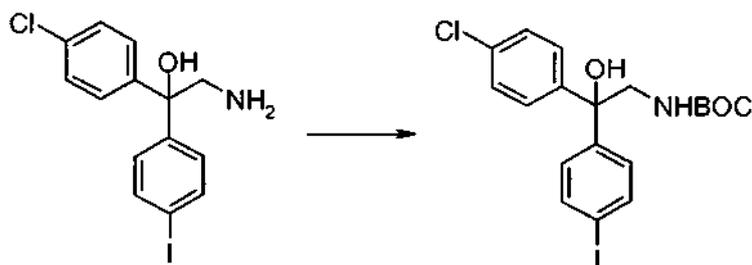
20 1B. 2-Amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-yodo-fenil]-etanol (reacción de apertura del anillo epoxi)



2-(4-Cloro-fenil)-2-(4-yodo-fenil)-oxirano (500 mg, 1,40 mmol) se disolvió en NH_3 2 M en metanol (5 ml, 10,0 mmol) y la disolución se calentó en un horno microondas a 130 °C durante 60 minutos. Tras enfriar, el disolvente se eliminó a vacío para suministrar el producto deseado. Se llevaron a cabo tres reacciones idénticas que dieron 1,55 g (98%) del producto 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-yodo-fenil]-etanol. El producto crudo era puro y se usó en la siguiente etapa sin purificación.

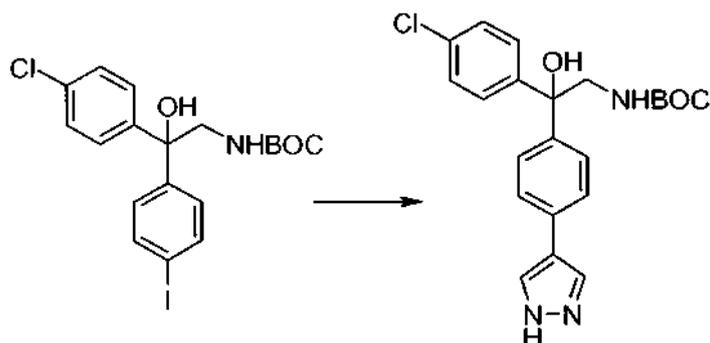
25

30 1C. Éster terc-butílico del ácido [2-(4-cloro-fenil)-2-hidroxi-2-(4-yodo-fenil)-etil-carbámico (protección con BOC)



5 El producto de amino alcohol de la etapa 1B (9,55 g, 25,56 mmol) se suspendió en 1,4-dioxano (220 ml) y se añadió NaOH 2 M (16,6 ml, 33,24 mmol). La mezcla se agitó intensamente hasta que fue homogénea. Se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (6,14g, 28,11 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 45°C durante 20 horas. Tras enfriar, la mezcla de reacción se concentró y se repartió entre EtOAc (150 ml) y agua (150 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (150 ml), se secó (MgSO₄) y se concentró para dar un aceite de color amarillo (14,08 g). El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida usando un sistema Biotage SP4 (columna 65i) eluyendo con acetato de etilo-gasolina (gradiente de acetato de etilo 5% - 40%) para dar el compuesto del título como un sólido de color blanco (10,0 g, 83%). R_t 3,73 min [M+H]⁺ 473,96

10 1D. Éster terc-butílico del ácido [2-(4-cloro-fenil)-2-hidroxi-2-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etil-carbámico (reacción de acoplamiento de Suzuki).



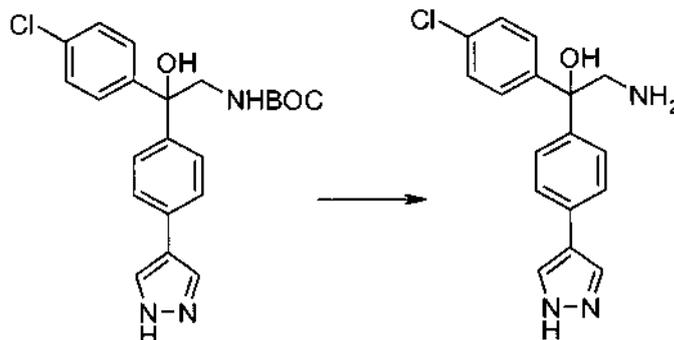
15 El éster terc-butílico del ácido [2-(4-cloro-fenil)-2-hidroxi-2-(4-yodo-fenil)-etil-carbámico (5 g, 10,6 mmol) se combinó con 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol (4,1 g, 21,11 mmol) y fosfato de potasio (tribásico, 7,88 g, 37,10 mmol) en un matraz de fondo redondo. A continuación, los sólidos se disolvieron en una mezcla disolvente formada por 1:1:1:1 de etanol, metanol, tolueno y agua (33 ml de cada disolvente). La disolución se desgasificó con nitrógeno y se añadió tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (0,612 g, 0,53 mmol). La mezcla se desgasificó con nitrógeno y a continuación se calentó a 85°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 2 h. A continuación, se dejó enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, A continuación se añadieron lotes adicionales de reactivos: fosfato de potasio (7,88 g, 37,10 mmol) y pirazol boronato (4,1 g, 21,11 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó con nitrógeno y se añadió un lote adicional de tetrakis(trifenilfosfina) paladio (0) (0,101 g, 0,087 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó y después se calentó bajo atmósfera de N₂ a 85°C durante 17 horas. Se volvieron a añadir lotes adicionales de reactivos (consultar las cantidades anteriores) y el calentamiento continuó a 85°C bajo atmósfera de nitrógeno durante 6,5 horas más. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se evaporó a vacío para eliminar el disolvente orgánico. La capa acuosa residual se diluyó con una disolución acuosa de NaOH 2N (150 ml) y a continuación se extrajo con acetato de etilo (150 ml). La capa orgánica se separó y se lavó con una disolución acuosa de NaOH 2N (150 ml) seguido de salmuera (150 ml). Se separó la capa orgánica, se secó (MgSO₄) y se concentró a vacío. El residuo se trituró con de dietil éter. El sólido se filtró a vacío y después se secó para dar el compuesto del título como un sólido de color blanco (2,55 g, 58%). LC/MS: (PS-B5) R_t 3,05 [M+H]⁺ 414,18. RMN ¹H (Me-d3-OD) 7,95 (2H, br s), 7,55 (2H, d), 7,48-7,41 (4H, m), 7,31 (2H, d), 3,87 (2H, q), 1,35 (9H, s).

20

25

30

35

1E. 2-Amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-yl)-fenil]-etanol (etapa de desprotección de BOC)

- 5 Una suspensión de la BOC amina (2,55 g, 6,16 mmol) en HCl saturado en Et₂O (50 ml) y metanol (50 ml) se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. La mezcla de reacción se concentró a vacío y se diluyó con NaOH 2 M (150 ml) y se extrajo con EtOAc (200 ml) (Nota- se requiera una agitación prolongada para disolver completamente la materia sólida). La capa orgánica se lavó con HCl 1 N (100 ml). A continuación, la capa acuosa se separó y se basificó a pH 12 con NaOH 2M. El producto deseado precipitó de la disolución y a continuación se recogió mediante filtración a vacío y se secó durante varios días (1,89 g, 98%). RMN ¹H (Me-Of₃-OD) δ 3,29-3,38 (2H, m), 7,32 (2H, d), 7,41-7,46 (4H, m), 7,55 (2H, d), 7,94 (2H, s).

1F. Separación quiral de enantiómeros individuales

- 15 Usando los métodos de LC quiral descritos a continuación, el compuesto (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol se separó del enantiómero R.

Condiciones analíticas quirales:

Eluyente: MeOH + DEA al 0,1% a temperatura ambiente
 Caudal: 0,7 ml/min
 Tiempo total: 25 min
 Volumen de inyección: 5 ul
 Conc. de la muestra: 1 mg/ml (en la fase móvil)
 Columna: DAICEL Chiralpak AD-H; 250 x 4,6 mm
 Longitud de onda: 230 o 257 nm

20

Condiciones preparativas quirales:

Eluyente: MeOH + DEA al 0,1 % a temperatura ambiente
 Caudal: 13 ml/min
 Tiempo total: 29 min
 Volumen de inyección: 250 ul
 Conc. de la muestra: 100 mg/ml (en la fase móvil)
 Columna: DAICEL Chiralpak AD-H; 250 x 20 mm
 Longitud de onda: 230 o 257 nm

- 25 El (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol se caracterizó mediante polarimetría, cromatografía quiral y cristalografía.

Polarimetría

- 30 Las actividades ópticas tanto del enantiómero S como del enantiómero R se determinaron mediante un polarímetro automático AA-10 (Optical Activity Limited).

Enantiómero S

22,42 mg del compuesto se disolvieron en 2 ml de MeOH, Longitud de la célula = 20 cm, Lectura = +0,31,

$$[\alpha]_D^{20} = +13.8^\circ$$

5 Enantiómero R

20,14 mg se disolvieron en 10 ml de MeOH (dilución mayor debido a aparición de burbujas en la célula del polarímetro), Lectura = -0,03, Longitud de la célula = 10 cm

$$[\alpha]_D^{20} = -14.8^\circ$$

10 Cromatografía quiral

Usando las condiciones analíticas quirales descritas anteriormente y un volumen de inyección de 5 μ l), el enantiómero S mostró un tiempo de retención de 15,283 minutos.

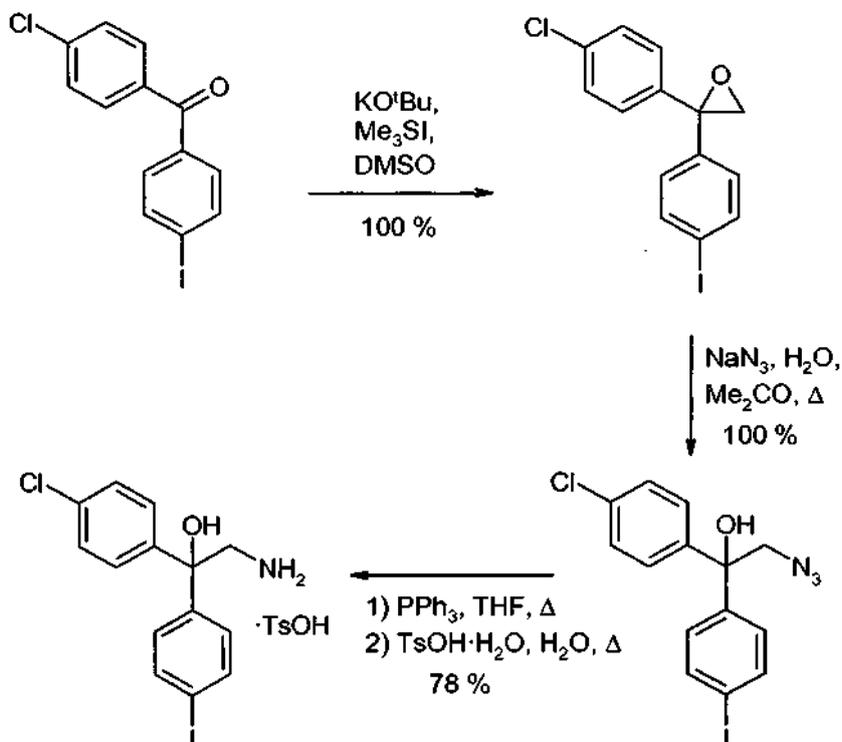
15 Cristalografía

El análisis cristalográfico del enantiómero S en bPKA-PKB se llevó a cabo usando el método descrito en Thomas G. Davies y col. "A Structural Comparison of Inhibitor Binding to PKB, PKA and PKA-PKB Chimera," J. Mol. Biol. 9 de enero de 2007: 17275837. Los análisis indicaron la presencia del enantiómero S unido a la proteína.

20

EJEMPLO 2**Síntesis alternativa de 2-Amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-yodo-fenil]-etanol**

25 Este ejemplo describe la preparación de 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-yodo-fenil]-etanol, compuesto intermedio 1B del Ejemplo 1.

**2A. (RS)-2-(4-clorofenil)-2-(4-yodofenil)oxirano**

30 Terc-butóxido de potasio (18,48 g, 165,0 mmol) se añadió a una suspensión rápidamente agitada de 4-cloro-4'-yodo-
benzofenona (51,38 g, 150,0 mmol) y yoduro de trimetilsulfonio (33,66 g, 165,0 mmol) en dimetilsulfóxido (200 ml) y la
mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (500 ml),
se lavó con agua (3 x 500 ml) y después con salmuera (500 ml). La capa orgánica se separó y el disolvente se eliminó
a vacío para dar (RS)-2-(4-clorofenil)-2-(4-yodofenil)oxirano (53,48 g, 100%) como un aceite de color amarillo pálido
35 que solidificó en reposo para dar un sólido de color crema. RMN ¹H (DMSO-d₆) 7,76 (2H, d), 7,45 (2H, d), 7,34 (2H, d),

7,12 (2H, d), 3,32 (2H, m). MS: [M-H]⁻ 355.

2B. (RS)-2-Azido-1-(4-clorofenil)-1-(4-yodofenil)etanol

5 Acida de sodio (13,86 g, 213,2 mmol) se añadió a una mezcla de (RS)-2-(4-clorofenil)-2-(4-yodofenil)oxirano (50,66 g, 142,1 mmol) en acetona (400 ml) y agua (40 ml) y la mezcla se agitó y se mantuvo a temperatura de reflujo durante 4 días. Tras enfriar a temperatura ambiente, se eliminó la acetona a *vacío*, el residuo se disolvió en acetato de etilo (500 ml), se lavó con agua (250 ml) y después con salmuera (250 ml), la capa orgánica se separó y el disolvente se eliminó a *vacío* para dar (RS)-2-azido-1-(4-clorofenil)-1-(4-yodofenil)etanol (56,77 g, 100%) como un aceite de color amarillo pálido que solidificó lentamente en reposo para dar un sólido de color crema. RMN ¹H (DMSO-d₆) 7,68 (2H, d), 7,44 (2H, d), 7,38 (2H, d), 7,24 (2H, d), 6,38 (1H, br s), 3,99 (2H, s). MS: [M-H]⁻ 398.

2C. Tolueno-4-sulfonato(RS)-2-amonio-1-(4-clorofenil)-1-(4-yodofenil)etanol

15 Trifenilfosfina (31,44 g, 120,0 mmol) se añadió a una disolución de (RS)-2-azido-1-(4-clorofenil)-1-(4-yodofenil)etanol (47,94 g, 120,0 mmol) en tetrahidrofurano (400 ml) y la mezcla se agitó y se mantuvo a temperatura de reflujo durante 5 horas; después de esto se añadieron ácido tolueno-4-sulfónico monohidrato (22,8 g, 120,0 mmol) y agua (40 ml) were added y la mezcla se agitó a y se mantuvo a temperatura de reflujo durante 16 horas más. Tras enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se evaporó a sequedad a *vacío*. Se añadió acetato de etilo (600 ml) y la mezcla se agitó rápidamente a temperatura ambiente durante 30 minutos para resuspender los sólidos. El sólido se recogió por filtración con succión, se enjuagó con acetato de etilo (3 x 250 ml), se succión hasta sequedad bajo presión reducida y se secó durante la noche a 50°C en un horno de vacío para dar el tolueno-4-sulfonato de (RS)-2-amonio-1-(4-clorofenil)-1-(4-yodofenil)etanol (51,37 g, 78%) en forma de un sólido de color incoloro. RMN ¹H (DMSO-d₆) 7,73 (2H, d), 7,68 (3H, br s), 7,47 (4H, m), 7,43 (2H, d), 7,28 (2H, d), 7,12 (2H, d), 6,60 (1H, br s), 3,67 (2H, s), 2,30 (3H, s). MS: [M+H]⁺ = 374.

El producto del Ejemplo 2C se puede convertir en el derivado de N-Boc según el método del Ejemplo 1C (pero usando un equivalente adicional de hidróxido de sodio para tener en cuenta la sal del ácido tolueno sulfónico) y a continuación se sometió a una reacción de acoplamiento de Suzuki seguido de la eliminación del grupo protector Boc tal como se describe en el Ejemplo 1D y en el Ejemplo 1E y la mezcla de enantiómeros resultante se resolvió según el método del Ejemplo 1F para obtener (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-yl)-fenil]-etanol.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

35 La actividad biológica del compuesto de fórmula (I) se describe en los siguientes ejemplos. Además, las propiedades biológicas del compuesto de fórmula (I) se han descrito en el póster de John F. Lyons y col., página 3512s, Sesión de Posters B Resumen B251, AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 22-26 de octubre, 2007, San Francisco, CA (copia disponible en el sitio web de Astex Therapeutics: www.astex-therapeutics.com o www.astex-therapeutics.com/investorsandmedia/publications)

EJEMPLO 3

Medida de la actividad inhibidora de la quinasa PKA (CI₅₀)

45 El compuesto de fórmula (I) se puede ensayar para determinar su actividad inhibidora de PK usando el dominio catalítico PKA procedente de Upstate Biotechnology (n°14-440) y el péptido de 9 restos específico de PK (GRTGRRNSI), también de Upstate Biotechnology (n°12-257), como sustrato. Se utilizó una concentración de enzima final de 1 nM que incluye MOPS 20 mM pH 7,2, 40 μM ATPγ³³P-ATP y 50 mM de sustrato. Los compuestos se añadieron en disolución en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta una concentración final en DMSO del 2,5%. Se dejó continuar la reacción durante 20 minutos antes de añadir un exceso de ácido ortofosfórico para desactivar la actividad. El γ³³P-ATP no incorporado se separa a continuación de las proteínas fosforiladas en una placa filtrante Millipore MAPH. Las placas se lavaron, se añadió reactivo de centelleo, y a continuación las placas se contaron en un instrumento Packard Topcount.

55 El % de inhibición de la actividad PKA se calcula y se representa gráficamente para determinar la concentración de compuesto de ensayo necesaria para inhibir el 50% de la actividad PKA (CI₅₀).

60 Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se ha descubierto que (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol proporcionaba una inhibición del 44% de PKA a una concentración 0,03 μM, mientras que el valor de la CI₅₀ de (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol era 0,25 μM. Los resultados demuestran que el enantiómero S es significativamente más potente que el enantiómero R en el ensayo PKA.

EJEMPLO 4

65 Medida de la actividad inhibidora de la quinasa PKB (CI₅₀)

La inhibición de la actividad de la proteína quinasa B (PKB) mediante los compuestos se puede determinar esencialmente como se describe en Andjelkovic y col. (Mol. Cell. Biol. 19, 5061-5072 (1999)) pero usando una proteína de fusión descrita como PKB-PIF y descrita completamente por Yang y col. (Nature Structural Biology 9, 940 - 944 (2002)). La proteína se purifica y se activa con PDK1 como se describe en Yang y col. El péptido AKTide-2T (H-A-R-K-R-E-R-T-Y-S-F-G-H-H-A-OH) obtenido de Calbiochem (n°123900) se utiliza como sustrato. Se utilizó una concentración de enzima final de 0,6 nM que incluye MOPS 20 mM pH 7,2, 30 μ M ATP γ - 33 P-ATP y 25 μ M de sustrato. Los compuestos se añadieron en disolución en DMSO hasta una concentración final en DMSO del 2,5%. Se dejó continuar la reacción durante 20 minutos antes de añadir un exceso de ácido ortofosfórico para desactivar la actividad. La mezcla de reacción se transfirió a una placa filtrante de fosfocelulosa donde el péptido se une u el ATP no utilizado se elimina por lavado. Tras el lavado, se añadió reactivo de centelleo y la actividad incorporada se midió mediante recuento por centelleo.

El % de inhibición de la actividad PKB se calcula y se representa gráficamente para determinar la concentración de compuesto de ensayo necesaria para inhibir el 50% de la actividad PKB (CI_{50}).

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se encontró que el valor de la CI_{50} de (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol era 0,01 μ M. mientras que el valor de la CI_{50} de (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol era 0,96 μ M. Los resultados demuestran que el enantiómero S es aproximadamente 100 veces más potente que el enantiómero R en el ensayo PKA.

EJEMPLO 5

Actividad hERG

La actividad del compuesto de fórmula (I) frente al canal del ion K^+ hERG se puede determinar mediante el ensayo descrito en el artículo de M. H. Bridgland-Taylor y col., Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 54 (2006), 189-199.

EJEMPLO 6

Determinación de la potencia frente al Citocromo P450

La potencia del compuesto del Ejemplo 1 frente a las enzimas del Citocromo P450 (CYP450) 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 y 2D6 se determinó usando los kits de cribado Pan Vera Vivid Cyp450 disponibles de Invitrogen (Paisley, Reino Unido). Las CYP450 se suministraron en forma de baculosomas que contenían el CYP450 y la NADPH reductasa y los sustratos usaron fueron los sustratos fluorescentes Vivid. Las mezclas de reacción finales fueron las siguientes:

1A2

fosfato de potasio 100 mM, pH 8, acetonitrilo al 1%, sustrato vivid 1A2 Blue 2 μ M, $NADP^+$ 100 μ M, CYP450 1A2 4 nM, glucosa-6-fosfato 2,66 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,32 U/ml.

2C9

fosfato de potasio 50 mM, pH 8, acetonitrilo al 1%, sustrato vivid Green 2 μ M, $NADP^+$ 100 μ M, CYP450 2C9 8 nM, glucosa-6-fosfato 2,66 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,32 U/ml.

2C19

fosfato de potasio 50 mM, pH 8, acetonitrilo al 1%, sustrato vivid Blue 8 μ M, $NADP^+$ 100 μ M, CYP450 2C19 4 nM, glucosa-6-fosfato 2,66 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,32 U/ml.

3A4

fosfato de potasio 100 mM, pH 8, acetonitrilo al 1%, sustrato vivid 3A4 Blue 10 μ M, $NADP^+$ 100 μ M, CYP450 3A4 2,5 nM, glucosa-6-fosfato 2,66 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,32 U/ml.

2D6

fosfato de potasio 100 mM, pH 8, acetonitrilo al 1%, sustrato vivid 2D6 Blue 5 μ M, $NADP^+$ 100 μ M, CYP450 2D6 16 nM, glucosa-6-fosfato 2,66 mM, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 0,32 U/ml.

Se realizó seguimiento de la fluorescencia durante 20 minutos en intervalos de 30 segundos en un lector de placa fluorescente Fluoroskan. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 390 nm y 460 nm para 1A2, 2C 19 y 3A4, 390 nm y 485 nm para 2D6 y 485 nm y 530 nm para 2C9. Las velocidades iniciales se determinaron a partir de las curvas de evolución.

El compuesto de ensayo se preparó en acetonitrilo y se volvió a ensayar frente a CYP450s a una concentración de 10 μ M.

El compuesto del Ejemplo 1 tenía un valor de CI_{50} superior a 10 μ M frente a 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 y 2D6.

5

EJEMPLO 7

Ensayo ELISA celular de Fosfo-Ser9 Gsk3 β ELISA frente a GSK3 β de pSer9

10 El efecto de inhibir PKB en células U87MG se determina por la capacidad de los compuestos para inhibir la fosforilación del sustrato directo posterior a GSK3 β en la serina 9. Las células se siembran en placas de 96 pocillos y se dejan recuperar durante la noche antes de añadir el compuesto inhibidor durante 1 hora. Tras 1 hora, se fijaron las células y se bloquearon con un 3% de paraformaldehído, 0,25% de glutaraldehído, 0,25% de Triton X100 y 5 % de Marvel en TBS-T. Después de esto, las células se incubaron con el anticuerpo primario dirigido contra la forma fosforilada de GSK3 β (Cell Signaling) durante la noche a 4°C. Después de lavar, las células se incubaron con anticuerpo secundario usando reactivos DELFIA (anticuerpo Eu-N1 dirigido contra IgG de conejo) durante 1 h, y después de la potenciación, las placas se leyeron en un lector de fluorescencia con resolución temporal a una excitación de 340 nm y una emisión de 640 nm. Todas las células se obtuvieron de ECACC (European Collection of Cell Cultures).

20

Protocolo

- 25 1. Las células U87MG se sembraron a 12.500 células/pocillo en 160ul de medio/pocillo en una placa de 96 pocillos
2. Incubar durante 24 horas a 37°C.
- 30 3. Tratar las células con el inhibidor y el control de DMSO
4. Incubar durante 1 hora a 37°C.
5. Verter el medio de la placa y transferir a papel
- 35 6. Añadir 100 μ l de **disolución de fijación** a cada pocillo (3% de paraformaldehído, 0,25% de glutaraldehído, 0,25% de Triton X100)
7. Incubar durante 30 minutos a 37°C.
- 40 8. Lavar 1x con agua/0,1% de Tween20
9. **Bloquear** con 100 μ l de 5% de leche/TBS-T
- 45 10. Incubar durante 30 minutos a 37 °C.
11. Diluir 100 μ l de **anticuerpo primario** en 5% de leche/TBS-T y añadir a cada pocillo (CST n° 9336 anticuerpo Phospho-Ser9 GSK3 β utilizado a 1:250)
 - 50 • incluir una columna de control sin anticuerpo -solamente 5% de leche/TBS
 - también se puede incluir una columna de IgG de conejo Zymed (02-6102 - 5 mg/ml) como control diluido en 5% de leche/TBS-T- a la misma concentración que el phospho-Ser9 GSK3 β si es necesario
12. Incubar durante la noche a 4 °C
- 55 13. Lavar 3x con agua/0,1% de Tween20
14. Diluir 100 μ l de **anticuerpo secundario** en tampón de ensayo Delfia y añadir a cada pocillo (anticuerpo Delfia Eu-N1 contra IgG de conejo usado a una concentración final de 0,30 μ g/ml)
- 60 15. Incubar durante 1 hora a 37°C
16. Lavar 3x con agua/0,1% de Tween20
17. Añadir a cada pocillo 100 μ l de disolución de potenciación Delfia
- 65 18. Agitar en un agitador de placas durante 15 minutos.

19. Leer en el programa Delfia (excitación 340nm - emisión 640 nm) = *Cuentas de europio*

20. Lavar 1x con agua/0,1 % de Tween20

5 21. Añadir 200 µl de disolución BCA por pocillo (BCA con sulfato de cobre 1:50)

22. Incubar durante 30 minutos a 37°C.

23. Leer a una absorbancia de 562 nm = *concentración de proteína*

10 En el ensayo mecanicista anterior se encontró que el compuesto (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol tenía un valor de la CI_{50} de 1,1 µM. mientras que el valor de la CI_{50} de (R)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol era >50 µM. es decir, el enantiómero R era esencialmente inactivo.

15 EJEMPLO 8

Protocolo de ensayo ROCK-II (h)

20 El compuesto (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol se ensayó en el ensayo ROCK-II que se muestra a continuación.

25 En un volumen final de reacción de 25 µl, se incubó ROCK-II (h) (5-10 mU) con 50 mM Tris pH 7,5, EGTA 0,1 mM, 30µM de KEAKEKRQEIQAKRRRLSSLRASTSKSGGSQK, 10 mM Acetato de Mg y [^{33}P -ATP] (actividad específica aproximada 500 cpm/pmol, la concentración que se requiere). La reacción se inició mediante la adición de la mezcla de MgATP. Tras incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante la adición de 5 µl de una disolución de ácido fosfórico al 3%. 10 µl de la reacción se distribuyeron a continuación en manchas sobre una estera de filtrado P30 y se lavaron tres veces durante 5 minutos en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes de secar y recuento por centelleo.

30 En el ensayo, (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol se encontró que tenían una CI_{50} de menos de 10 nM en el anterior ensayo, es decir, por debajo del límite del ensayo.

35 EJEMPLO 9

Ensayo radiométrico de p70S6K

40 El compuesto (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol se ensayó en el ensayo radiométrico p70S6K descrito a continuación.

Descripción general

La enzima P70S6 se adquirió de Upstate y se usó en el ensayo a 2 nM.

45 El cóctel S6 del sustrato (AKRRRLSSLRA) se usó a 25µM (Km no se ha determinado). En la reacción de transferencia del fosforilo, la ^{33}P -fosfato del ATP se transfirió al resto serina. La mezcla de reacción se transfirió a una placa filtrante de fosfocelulosa donde el péptido se une y el ATP no utilizado se elimina por lavado. Tras el lavado, se añadió reactivo de centelleo y la actividad incorporada se midió mediante recuento por centelleo.

50 Reactivos

P70S6 quinasa (T412E) activa de Upstate (nº 14-486)
cóctel sustrato con quinasa S6 (T412E) activa de Upstate (nº 20-122)

ES 2 511 817 T3

Tampón de ensayo de
MOPS de 10mM pH 7,0
0,1 mg/ml de BSA
0,001% de Brij-35
glicerol al 0,5%,
EDTA 0,2 mM,
MgCl₂ 10 mM,
β-mercaptoetanol al 0,01%
Preparada como una disolución madre 10X almacenada
a 20°C en alícuotas de 2 ml
15 μM de ATP

5 ATP (disolución madre 10mM) añadidos de manera reciente a partir de disoluciones madre concentradas. el ATP se romperá en el tiempo, mantenido en hielo en la medida de lo posible y se usarán alícuotas pequeñas para asegurar que el depósito madre es reciente.

10 γ ³³P-ATP APBiotech (BF1000)
ácido ortofosfórico al 12,5%
ácido ortofosfórico al 0,5% Microscint 20 (Packard)

Preparación del ensayo

Mezcla del enzima (por 1 ml - 100 puntos de ensayo):

15 743.75μl H₂O
250 μl 10 x tampón de ensayo
3,75 μl 10mM de ATP
2,5 μl de enzima

20 Mezcla de sustrato (por 1 ml - 100 puntos de ensayo):

25 250 μl de cóctel de sustrato S6
750 μl H₂O
3,5 μl ³³P-ATP (BF1000 de APBiotech)

Se supone que la cantidad de ³³P-ATP añadido es en la fecha de referencia. La cantidad exacta necesita ajustarse para el tiempo.

30 Compuestos - preparar una curva de dilución en DMSO en una placa de polipropileno de 96 pocillos hasta una concentración final del ensayo 40x (DMSO final al 2,5%).

Diluir 1:8 en agua (es suficiente añadir 50 μl del compuesto a 35 μl de agua).

Configuración del ensayo

35 A una placa de polipropileno de 96 pocillos, añadir en orden:

40 5 μl de compuesto
10 μl de mezcla de sustrato 10 μl de mezcla de enzima

45 La concentración final de ATP es de aproximadamente 15 μM. KM para el ATP calculado a 47μM radiométricamente. Los controles son "sin compuesto" (DMSO solo) y "sin enzima"(usar 10 μl de la mezcla de enzima antes de añadir la enzima). Cubrir con un precinto la placa (TOPSeal A - Packard) o tapa de plástico de la placa filtrante (barrera de radiación moderada). Mezclar con agitación suave incubar a temperatura ambiente durante 50 minutos. Detener la reacción añadiendo 20 μl de ácido ortofosfórico al 2%.

Etapa de filtración

50 Prehumedecer los pocillos de una placa Millipore MAPH NOB con 50 μl de tampón de lavado de ácido ortofosfórico al 0,5%. Filtrar el líquido a través de una unidad de filtración a vacío Millipore. Transferir la totalidad de la reacción detenida a los pocillos. Filtrar a través. Lavar dos veces con 200 μl de ampón de lavado de ácido ortofosfórico al 0,5%. Concentrar a vacío hasta casi sequedad. Retirar el soporte de la placa y dejar secar el filtro adicionalmente sobre papel

secante. Introducir la placa en el adaptador del instrumento Packard TopCount. Añadir 20 µl de reactivo de centelleo Microscint 20, precintado con una lámina de Topseal A y contar durante 30 s en el TopCount.

5 En el ensayo, se encontró que el (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol tenía un valor de la Cl_{50} de 12 nM.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

EJEMPLO 10

10 (i) Formulación en comprimidos

15 Una composición en comprimidos que contenía una composición como la que se define en el presente documento se preparó mezclando 50 mg del compuesto con 197 mg de lactosa (BP) como diluyente, y 3 mg de estearato de magnesio como lubricante y comprimiendo para conformar un comprimido de manera conocida.

(ii) Formulación en cápsula

20 Se preparó una formulación en cápsula mezclando 100 mg de una composición como se define en el presente documento con 100 mg de lactosa y rellenando la mezcla resultante en cápsulas de gelatina dura opacas normalizadas.

(iii) Formulación inyectable I

25 Se puede preparar una composición parenteral para su administración mediante inyección disolviendo una composición como se define en el presente documento (por ejemplo, en forma de sal) en agua que contiene propilenglicol al 10% para obtener una concentración de principio activo de 1,5 % en peso. A continuación, la disolución se esteriliza mediante filtración, se rellena una ampolla y se precinta.

30 (iv) Formulación inyectable II

35 Se prepara una composición parenteral para inyección disolviendo en agua una composición como se define en el presente documento (por ejemplo, en forma de sal) (2 mg/ ml) y manitol (50 mg/ ml), la disolución se esteriliza por filtración y se introduce en viales o ampollas de 1 ml precintables.

(v) Formulación inyectable II

40 Se puede preparar una formulación para administración i.v. por inyección o infusión disolviendo el compuesto de fórmula (I) (por ejemplo, en forma de sal) en agua a 20 mg/ml. El vial se precinta a continuación, y se esteriliza por autoclavado.

(vi) Formulación inyectable II

45 Se puede preparar una formulación para administración i.v. por inyección o infusión disolviendo el compuesto de fórmula (I) (por ejemplo, en forma de sal) en agua que contiene un tampón (por ejemplo, acetato 0,2 M pH 4,6) a 20 mg/ml. El vial se precinta a continuación, y se esteriliza por autoclavado.

(vii) Formulación para inyección subcutánea

50 Se prepara una composición para administración subcutánea mezclando una composición como se define en el presente documento con aceite de maíz de calidad farmacéutica para obtener una concentración de 5 mg/ml. La composición se esteriliza y se introduce en un envase adecuado.

(viii) Formulación liofilizada

55 Alícuotas del compuesto de fórmula (I) formulado se introducen en viales de 50 ml y se liofilizan. Durante la liofilización, las composiciones se congelan mediante un protocolo de congelación en una etapa a (-45 °C). La temperatura se aumenta hasta -10 °C para hibridación, y después se disminuye hasta congelamiento a -45 °C, seguido por secado primario a +25 °C durante aproximadamente 3400 minutos, seguido por un secado secundario por etapas crecientes si la temperatura llega a 50 °C. La presión durante el secado primario y secundario se configura a 80 millitor (10,6 Pa).

Equivalentes

65 Los ejemplos anteriores se presentan con el fin de ilustrar la invención y no se debería considerar que impongan cualquier limitación sobre el alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

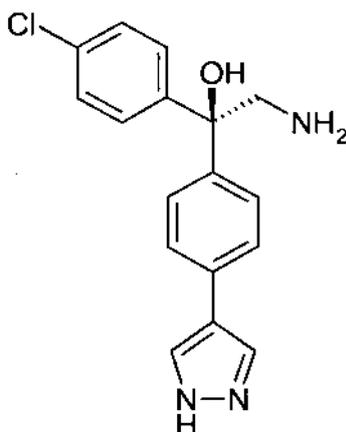
1. Una composición que comprende 2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo, al menos un 90% del cual está en la forma enantiomérica S.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 donde al menos un 98% está en la forma enantiomérica S.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1 donde al menos un 99% está en la forma enantiomérica S.

4. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el (S)-2-amino-1-(4-cloro-fenil)-1-[4-(1H-pirazol-4-il)-fenil]-etanol está en la forma de una base libre o de una sal de adición de ácido.

5. Un compuesto de la fórmula (I):



o una sal, solvato, tautómero o N-óxido del mismo, donde dicho compuesto tiene una pureza enantiomérica de al menos un 90%.

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho compuesto tiene una pureza enantiomérica de al menos un 98%.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho compuesto tiene una pureza enantiomérica de al menos un 99%.

8. Un compuesto de la fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en la forma de una base libre o una sal, solvato o tautómero del mismo.

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 que es una disal formada con ácido clorhídrico.

10. Una composición farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.

11. una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en medicina.

12. una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en la profilaxis o el tratamiento de una patología o dolencia que se selecciona a partir de un carcinoma de la vejiga, mama, colon, de riñón, epidérmico, hígado, pulmón, de esófago, vesícula biliar, de ovario, páncreas, estómago, cuello de útero, endometrio, tiroides, próstata, o piel, un tumor hematopoyético o linaje linfóide, un tumor hematopoyético de linaje mielóide, cáncer de tiroides folicular, un tumor de origen mesenquimal, un tumor del sistema nervioso central o periférico, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xeroderma pigmentoso, queratoacantoma, cáncer de tiroides folicular, o sarcoma de Kaposi; cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de esófago, cáncer espinocelular y carcinomas de pulmón no microcíticos.

13. El uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una cualquiera de las patologías o dolencias descritas en la reivindicación 12.