

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 352**

51 Int. Cl.:

A61K 31/505 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2008** **E 08799418 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2205242**

54 Título: **Combinaciones de compuestos inhibidores de fosfoinositida 3-cinasa y agentes quimioterapéuticos, y métodos para su uso**

30 Prioridad:

12.09.2007 US 971773 P

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

05.06.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (50.0%)

1 DNA Way

South San Francisco CA 94080-4990, US y

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

BELVIN, MARCIA;

HOEFlich, KLAUS;

SAMPATH, DEEPAK;

VIJAPURKAR, ULKA;

WALLIN, JEFFREY;

JOHNSON, LEISA;

SINGH, MALLIKA;

PATEL, SONAL y

FRIEDMAN, LORI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 352 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

Combinaciones de compuestos inhibidores de fosfoinositida 3-cinasa y agentes quimioterapéuticos, y métodos para su uso

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere generalmente a combinaciones farmacéuticas de compuestos con actividad contra trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer, y que incluyen compuestos que inhiben la actividad de la cinasa PI3. La invención se refiere también a métodos de uso de los compuestos para el diagnóstico *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* o el tratamiento de células de mamífero, o de condiciones patológicas asociadas.

Fundamentos de la invención

- 10 El fosfatidil-inositol es uno de los fosfolípidos que se encuentran en las membranas de las células, y que participan en la transducción señales intracelulares. La señalización celular a través de fosfoinosítidos 3'-fosforilados ha sido implicada en una variedad de procesos celulares, por ejemplo, la transformación maligna, la señalización de factores de crecimiento, la inflamación y la inmunidad (Rameh et al. (1999) J. Biol Chem. 274: 8347 - 8350). La enzima responsable de la generación de estos productos de señalización fosforilados, fosfatidil inositol 3-cinasa (también denominada PI3-cinasa o PI3K), fue identificada originalmente como una actividad asociada con oncoproteínas virales y tirosina cinasas receptoras del factor de crecimiento que fosforilan el fosfatidil inositol (PI) y sus derivados fosforilados en el hidroxilo 3' del anillo de inositol (Panayotou et al (1992) Trends Cell Biol 2: 358 - 60). Las fosfoinositida 3-cinasas (PI3K) son cinasas de lípidos que fosforilan lípidos en el resto 3-hidroxilo de un anillo de inositol (Whitman et al (1988) Nature, 332: 664). Los fosfolípidos 3-fosforilados (PIP3s) generados por PI3-cinasas actúan como cinasas que reclutan segundos mensajeros con dominios de unión con lípidos (incluyendo regiones de homología plekstrin (PH)), tales como Akt y PDK1, cinasa-1 fosfoinositido-dependiente (Vivanco et al (2002) Nature Cancer Rev. 2: 489; Phillips et al. (1998) Cáncer 83:41).

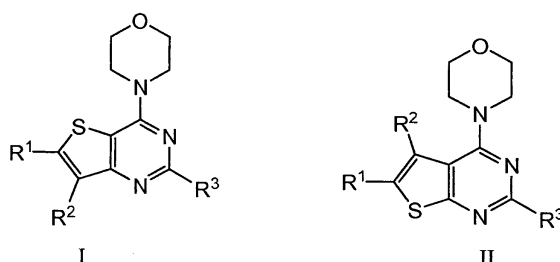
- La familia de PI3 cinasa comprende al menos 15 enzimas diferentes sub-clasificadas por su homología estructural y se dividen en 3 clases basadas en la homología de secuencias y el producto formado por la catálisis enzimática. Las cinasas PI3 de clase I se componen de 2 subunidades: una subunidad catalítica de 110 kd y una subunidad reguladora de 85 kd. Las subunidades reguladoras contienen dominios SH2 y se unen a residuos de tirosina fosforilados por receptores del factor de crecimiento con una actividad de tirosina cinasa o productos oncogénicos, induciendo de esta manera la actividad de PI3K de la subunidad catalítica p110, que fosforila su sustrato lipídico. Las cinasas PI3 de clase I están involucradas en importantes eventos de transducción de señales aguas abajo de citocinas, integrinas, factores de crecimiento e inmunorreceptores, lo que sugiere que el control de esta ruta puede conducir a efectos terapéuticos importantes tales como la modulación de la proliferación celular y la carcinogénesis. Las PI3K de clase I pueden fosforilar fosfatidil inositol (PI), fosfatidil inositol-4-fosfato, y fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP2) para producir fosfatidil inositol-3-fosfato (PIP), fosfatidil inositol-3,4-bisfosfato y fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato, respectivamente. Las PI3Ks de clase II fosforilan PI y fosfatidil inositol-4-fosfato. Las PI3Ks de clase III pueden fosforilar solamente PI. La principal isoforma de la PI3-cinasa en el cáncer es la PI3-cinasa de clase I, p110 α . (patente de Estados Unidos No. 5.824.492; patente de EE.UU. No. 5.846.824; patente de Estados Unidos No. 6.274.327). Otras isoformas están implicadas en enfermedades cardiovasculares e inmuno-inflamatorias (Workman P (2004) Biochem Soc Trans 32: 393 - 396; Patel et al (2004) Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. (Abstract LB-247) 95th Annual Meeting, marzo 27 - 31, Orlando, Florida, EE.UU.; Ahmadi K y Waterfield MD (2004) "Phosphoinositide 3-Kinase: Function and Mechanisms" Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz W J, Lane M D eds) Elsevier/Academic Press), y las mutaciones de oncogenes en PI3 cinasa (Samuels et al (2004), Science 304: 554). Las mutaciones oncogénicas de p110 alfa se han encontrado con una frecuencia significativa en tumores sólidos de colon, mama, cerebro, hígado, ovario, gástrico, de pulmón, y cabeza y cuello. Se encuentran anomalías PTEN en cánceres glioblastoma, melanoma, próstata, endometrio, ovario, mama, pulmón, cabeza y cuello, hepatocelular, y de tiroides.

- La purificación inicial y la clonación molecular de PI3 cinasa reveló que era un heterodímero consistente en subunidades p85 y p110 (Otsu et al (1991) Cell 65: 91 - 104; Hiles et al (1992) Cell 70: 419 - 29). Desde entonces, se han identificado cuatro PI3Ks de Clase I distintas, designadas α PI3K (alfa), β (beta), δ (delta), y ω (gamma), considerando cada una en una subunidad catalítica de 110 kDa distinta y una subunidad reguladora. Más concretamente, tres de las subunidades catalíticas, es decir p110 alfa, beta p110 y p110 delta, interaccionan cada una con la misma subunidad reguladora, p85; mientras que p110 gamma interacciona con una subunidad reguladora distinta, p101. Los patrones de expresión de cada una de estas PI3K en células y tejidos humanos también son distintos. En cada uno de los subtipos de PI3K alfa, beta y delta, la subunidad p85 actúa localizando PI3 cinasa a la membrana plasmática mediante la interacción de su dominio SH2 con restos de tirosina fosforilados (presente en un contexto de secuencia adecuado) en proteínas diana (Rameh et al (1995) Cell, 83: 821 - 30; Volinia et al (1992) Oncogene, 7: 789 - 93).

La ruta PI3 cinasa/Akt/PTEN es una diana atractiva para el desarrollo de fármacos contra el cáncer ya que sería de esperar que tales agentes inhibirían la proliferación, revertirían la represión de la apoptosis y superarían la

resistencia a agentes citotóxicos en las células cancerosas. Se han publicado inhibidores de PI3 cinasa (Yaguchi et al (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98 (8): 545 - 556; patente de Estados Unidos No. 7.173.029; patente de EE.UU. No. 7.037.915; patente de EE.UU. No. 6.608.056; patente de Estados Unidos No. 6.608.053; patente de EE.UU. No. 6.838.457; patente de Estados Unidos No. 6.770.641; patente de Estados Unidos No. 6.653.320; patente de Estados Unidos No. 6.403.588; documentos WO 2006/046031, WO 2006/046035, WO 2006 / 046040; WO 2007/042806; WO 2007/042810; WO 2004/017950, US 2004/092561, WO 2004/007491, WO 2004/006916, WO 2003/037886, US 2003/149074, WO 2003/035618, WO 2003/034 997, US 2003/158212; EP 1417976, US 2004/053946; JP 2001247477; JP 08175990; JP 08176070). Los análogos de wortmanina tienen actividad de cinasa PI3 en mamíferos (patente de Estados Unidos N° 6.703.414; WO 97/15658.).

Los compuestos de tienopirimidina de fórmulas I y II tienen unión p110 alfa, actividad inhibidora de cinasa PI3 e inhiben el crecimiento de células cancerosas (documentos WO 2006/046031, US 2008/0039459, US 2008/0076768, US 2008/0076758, WO 2008 / 070740; WO 2008/073785).



El compuesto de Fórmula I, GDC-0941 (Genentech Inc.), es un inhibidor selectivo, biodisponible por vía oral, de PI3K con propiedades farmacocinéticas y farmacéuticas prometedoras (Belvin et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99ª: 15 de abril, Abstract 4004; Folkes et al, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99ª: 14 de abril, Abstract LB-146; Friedman et al, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2008, 99ª: 14 de abril, Abstract LB-110).

Las combinaciones de agentes terapéuticos farmacéuticos anticancerosos administrados simultáneamente o secuencialmente en un régimen de dosificación son ahora comunes en el tratamiento del cáncer. La exitosa terapia de combinación proporciona un efecto mejor e incluso sinérgico sobre la monoterapia, es decir, el tratamiento farmacéutico limitado a un fármaco. Se ha estudiado la terapia de combinación para el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer, incluyendo la actividad antitumoral de erlotinib en combinación con capecitabina en modelos de xenoinjerto tumoral humano (Ouchi et al (2006) Cancer Chemother. Pharmacol. 57: 693 - 702), y erlotinib en combinación con gemcitabina y cisplatino en modelos de cáncer de pulmón no microcítico (o de células no pequeñas: Non Small Cell Lung Cancer: NSCLC) de xenoinjertos tumorales (Higgins et al (2004) Anti-Cancer Drugs 15: 503 - 512). La investigación preclínica ha sido la base para la predicción de la sinergia de la etapa clínica de combinaciones terapéuticas farmacéuticas anticancerosas, que incluyen capecitabina y taxanos para el tratamiento del cáncer de mama (Sawada et al (1998) Clin. Cancer Res. 4: 1013 - 1019). Ciertas dosis y programas de terapia de combinación de capecitabina y taxano pueden mejorar la seguridad sin comprometer la eficacia (O'Shaughnessy et al (2006) Clin. Breast Cancer 7 de abril (1): 42 - 50). Los efectos sinérgicos de combinaciones antifúngicas in vitro han sido correlacionados con la sinergia en estadio clínico (Steinbach et al (2003) Clin. Inf. Dis. 1 de octubre; 37 Suppl 3: S188 - 224).

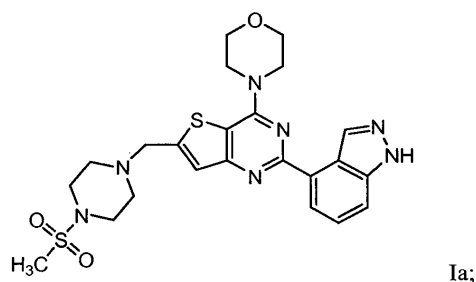
El documento WO 2007/127175 describe compuestos furano- y tieno-piridimina sustituidos con morfolina que tienen actividad como inhibidores de PI3K. El documento WO2004/065390 describe compuestos del mismo tipo estructural que la fórmula II anterior y su uso en terapia de combinación con una diversidad de agentes terapéuticos distintos, incluyendo inhibidores de PDE4 e inhibidores de COX-2. Hayakawa et al., Bioorganic and Medical Chemistry Letters 17 (2007) 2438 - 2442, describe compuestos del mismo tipo estructural que la fórmula (I) anterior y su actividad como inhibidores de PI3K.

Sumario de la invención

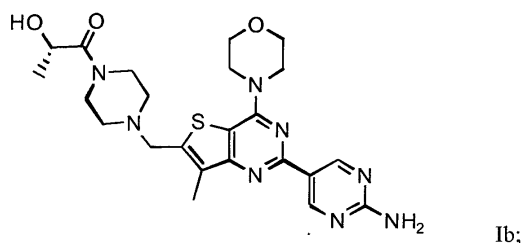
La invención se refiere de un modo general a compuestos de tienopirimidina de Fórmulas Ia y Ib con actividad anticancerosa y, más específicamente, con la actividad inhibidora de cinasa PI3, administrado en combinación con agentes quimioterapéuticos para tratar ciertos tipos de tumores. Ciertas combinaciones de compuestos de Fórmula Ia y Ib con agentes quimioterapéuticos muestran efectos sinérgicos en la inhibición del crecimiento de células cancerosas in vitro e in vivo. Las combinaciones de la invención inhiben el crecimiento de tumores en mamíferos y pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes humanos con cáncer.

La invención proporciona una combinación terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il) -6- ((4- (metilsulfonil) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2 -d] pirimidin-4-

il) morfolina (US 2008/0076768; WO 2006/046031) también conocido como GDC-0941 (Genentech, Inc.) y que tiene la fórmula Ia:



5 (S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona (documento WO 2008/070740) que tiene la fórmula Ib



10 y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib; en donde la combinación terapéutica tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de tipo tumoral, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC50 obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro* y siendo elegido el tipo de tumor entre tumores de mama, cervical, colon, de endometrio, glioma, pulmón, melanoma, de ovarios, pancreático y de próstata.

15 Como se discute en Chou et al., "Advances in Enzyme Regulation", Pergamon Press, Oxford, GB, vol. 22, 1 enero 1984, págs. 27 – 55, una puntuación CI < 1 indica sinergia.

Los compuestos de fórmula Ia y Ib son disponibles por vía oral y tienen actividad antitumoral de agente único en múltiples modelos de cáncer humano.

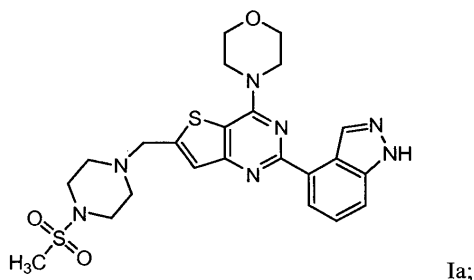
20 Los compuestos de fórmula Ia y Ib son potentes inhibidores de PI3K con propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas similares a las de los fármacos. Estos compuestos muestran selectividad para PI3Ks de clase Ia sobre la clase Ib, en particular para el subtipo PI10 alfa.

25 Las composiciones farmacéuticas y combinaciones terapéuticas de la invención comprenden un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib.

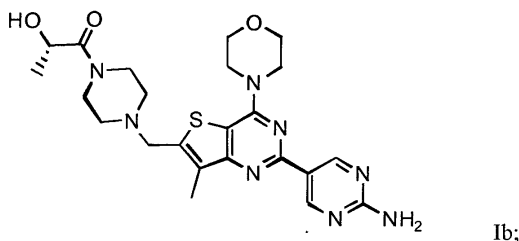
Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender además un vehículo aceptable farmacéuticamente.

30 Otro aspecto de la invención proporciona un kit que comprende a) una combinación terapéutica de la invención como se definió antes y b) instrucciones para el uso en el tratamiento de un tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y de próstata.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un producto que comprende un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonyl) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2 -d] pirimidin-4-il) morfolina que tiene la fórmula Ia:

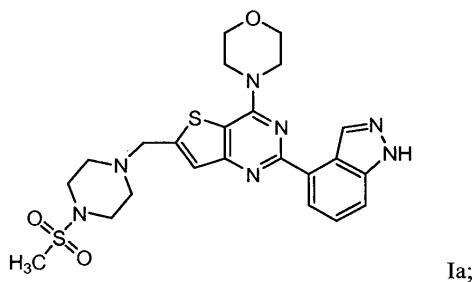


5 (S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona (documento WO 2008/070740) que tiene la fórmula Ib

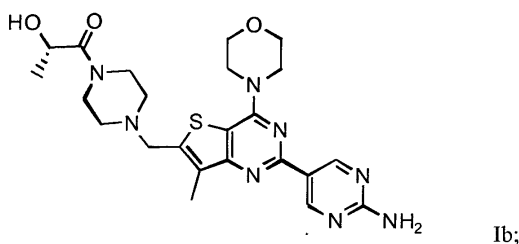


y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; y un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib; como una formulación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un tipo de tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y próstata; en donde la combinación de dicho compuesto y dicho agente quimioterapéutico tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de un tipo de tumor como se define antes, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC50 obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

En otro aspecto la presente invención proporciona un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metil-sulfonyl) piperazin-1-il)metil)tieno [3,2 -d] pirimidin-4-il) morfolina que tiene la fórmula Ia:



(S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona que tiene la fórmula Ib:



y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente, para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib para el tratamiento de un tipo de tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y próstata; en donde la combinación de dicho compuesto y dicho agente quimioterapéutico tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de un tipo de tumor como se definió antes, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC₅₀ obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

La invención puede ser usada en un método para la determinación de compuestos a usar en combinación para el tratamiento de cáncer, que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de la invención como se definió anteriormente a células de cáncer de mama amplificadas con HER2 en medio de membrana de base reconstituida rico en laminina, en donde el agente quimioterapéutico se dirige, se une a, o modula, un receptor HER2, y b) medir la inhibición de la proliferación celular en donde las células mamarias malignas y no malignas son discriminadas por una o más diferencias fenotípicas elegidas entre la viabilidad de las células y la morfogénesis acinar.

Otra forma en la que puede usarse la invención es un método para la determinación de compuestos a usar en combinación para el tratamiento del cáncer, que comprende: a) administrar una combinación terapéutica de la invención como se definió anteriormente a una línea de células tumorales *in vitro* con una mutación K-ras, y b) medir un efecto sinérgico o no sinérgico.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1-A muestra un resumen de los ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de Fórmula Ia y diversos agentes quimioterapéuticos, dosificados simultáneamente. Las líneas de células se caracterizan por el tipo de tumor y la presencia de mutación conocida. Los valores medidos de EC₅₀ individuales del agente quimioterapéutico y el compuesto de fórmula Ia (GDC-0941) se comparan con el valor de EC₅₀ de la combinación y se calcula una puntuación del índice de combinación por el método de Chou y Talalay (Chou, T. y Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22: 27 - 55). La intensidad de la sinergia se puntuó utilizando el sistema de clasificación y está listado en la última columna.

La figura 1-B muestra un resumen de los ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ib y varios agentes quimioterapéuticos. Las líneas de células se caracterizan por el tipo de tumor y la presencia de la mutación Ras. Los valores de EC₅₀ medidos individuales del agente quimioterapéutico y el compuesto de la Fórmula Ib se comparan con el valor EC₅₀ de la combinación y se calcula una puntuación del índice de combinación por el método de Chou y Talalay (Chou, T. y Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22: 27 - 55). La intensidad de la sinergia se puntuó utilizando el sistema de clasificación de Chou y Talalay.

La figura 2 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células *in vitro* (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4 X EC₅₀) de derecha a izquierda de 5-FU, compuesto de Fórmula Ia (GDC-0941), y la combinación de 5-FU y Fórmula Ia. Las células MDA-MB-361 (tipo de tumor de mama) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con 5-FU (medio), y se postdosifican con la fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con 5-FU (abajo).

La figura 3 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células *in vitro* (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC₅₀) de derecha a izquierda de la gemcitabina, compuesto de Fórmula Ia (GDC-0941), y la combinación de gemcitabina y Fórmula Ia. Las células Cal-51 (tipo de tumor de mama) se tratan simultáneamente (arriba), y se postdosifican con Fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con gemcitabina (abajo).

La figura 4 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de la gemcitabina, compuesto de Fórmula la (GDC-0941), y la combinación de gemcitabina y Fórmula la. Las células MDA-MB-361 (tipo de tumor de mama) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con gemcitabina (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con gemcitabina (parte inferior).

La figura 5 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de erlotinib, compuesto de Fórmula la (GDC-0941), y la combinación de erlotinib y Fórmula la. Las células A549 (tipo de tumor de pulmón con G12C K-ras) las células se tratan simultáneamente (parte superior), de predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con erlotinib (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con erlotinib (inferior).

La figura 6 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de erlotinib, compuesto de Fórmula la (GDC-0941), y la combinación de erlotinib y Fórmula la. Las células H23 (tipo de tumor de pulmón, con la mutación G12C K-ras) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con erlotinib (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con erlotinib (abajo).

La figura 7 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de la temozolomida, compuesto de fórmula la (GDC-0941), y la combinación de temozolomida y fórmula la. Las células U87 (tipo de tumor glioma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior).

La figura 8 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de la temozolomida, compuesto de fórmula la (GDC-0941), y la combinación de temozolomida y la fórmula la. Las células A375 (tipo de tumor melanoma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior).

La figura 9 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de la temozolomida, compuesto de fórmula la (GDC-0941), y la combinación de temozolomida y fórmula la. Las células MALME-3M (tipo de tumor melanoma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con fórmula la 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior).

La figura 10 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de la doxorrubicina, compuesto de fórmula la (GDC-0941), y la combinación de doxorrubicina y fórmula la. Las células SKOV3 (tipo de tumor de ovario) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con doxorrubicina (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con doxorrubicina (parte inferior).

La figura 11 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de docetaxel, compuesto de Fórmula la (GDC-0941), y la combinación de docetaxel y la Fórmula la. Las células PC3 (tipo de tumor de próstata) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula la 4 horas antes de la dosificación con docetaxel (medio), y se postdosifican con la fórmula la 4 horas después de la dosificación con docetaxel (parte inferior).

La figura 12 muestra un diagrama de puntos de los experimentos de sinergia (Índice de Combinación) de erlotinib y compuesto de Fórmula la (GDC-0941) de la figura 1-A frente a líneas de células tumorales sin mutaciones Ras (Ras WT, Expts. 41, 42, 73 - 75, 77, 79 - 81, 83, 84, 86) y con mutaciones Ras (Ras Mut, Expts. 40, 69 - 72, 76, 78, 82, 144, 145).

La figura 13 muestra un diagrama de puntos de los experimentos de sinergia (Índice de Combinación) de PD-0325901 y compuesto de Fórmula la (GDC-0941) de la figura 1-A frente a líneas de células tumorales sin mutaciones Ras (Ras WT, Expts. 22 - 24, 26 - 28, 31 - 33, 36 - 38, 55, 59, 61, 63 - 66, 85, 89 - 98, 149, 161, 162) y con mutaciones Ras (Ras Mut, Expts. 25, 30, 34, 35, 39, 56 - 58, 60, 62, 67, 68, 146 - 148, 150).

La figura 14 muestra los resultados a lo largo del tiempo del tratamiento de una línea de células tumorales sinérgica MDA-MB-361 y una línea de células tumorales no sinérgica MT-3 con gemcitabina a niveles de dosificación de EC80. Los niveles de pAKT se midieron a T = 0 (no tratado: UT), 1 h, 4 h, 6 h, y 24 h.

- 5 La figura 15 muestra un diagrama de puntos de la sinergia (Índice de Combinación) de docetaxel, 5-FU o gemcitabina y compuesto de fórmula la (GDC-0941) de la figura 1-A frente a líneas de células tumorales que muestran un aumento de pAkt o ningún aumento de pAkt.

- 10 La figura 16 muestra los resultados de la citometría de flujo FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter: clasificación de células activada por fluorescencia): (arriba) células MB361 son (de izquierda a derecha) no tratadas, tratadas con Fórmula la, 5FU, y primero con 5FU y después con compuesto de fórmula la (GDC-0941); (medio) las células PC3 (de izquierda a derecha) son no tratadas, tratadas con fórmula la, docetaxel, simultáneamente con compuesto de fórmula la y docetaxel, primero con fórmula la y luego con docetaxel, y primero con docetaxel, y después con Fórmula la; y (abajo) las células MB361 son (de izquierda a derecha) no tratadas, tratadas con Fórmula la, gemcitabina, y primero con gemcitabina y luego con Fórmula la.

- 15 La figura 17 muestra el tratamiento de células BT474M1 en cultivos tridimensionales (3D). El crecimiento de los ácinos y la morfogénesis se correlacionan con la producción de ATP celular en unidades relativas de luz (RLU) en medio al 10% de FBS, con y sin heregulin1 1 nM por tratamiento con (de izquierda a derecha): medio, DMSO, combinación de 20 µg/ml de trastuzumab y 25 µg/ml de pertuzumab, compuesto de Fórmula la 250 nM (GDC-0941), y la combinación de 20 µg/ml de trastuzumab, 25 µg/ml de pertuzumab, y compuesto de fórmula la 250 nM.

- 20 La figura 18 muestra el tratamiento de células BT474M1 en cultivo tridimensional (3D). El crecimiento de los ácinos y la morfogénesis se correlacionan con la producción de ATP celular en unidades relativas de luz (RLU) en medio al 10% de FBS, con y sin heregulin1 1 nM por tratamiento con (de izquierda a derecha): DMSO, combinación de 20 µg/ml de trastuzumab y 25 µg/ml de pertuzumab, compuesto de fórmula lb 20 nM, y la combinación de 20 µg/ml de trastuzumab, 25 µg/ml de pertuzumab, y compuesto de fórmula lb 250 nM.

- 25 La figura 19 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones atímicos CD-1 (Charles River Labs) con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-361.1 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (metilcelulosa al 0,5%/Tween 80 al 0,2%), 150 mg/kg de fórmula la (GDC-0941), 5 mg/kg de docetaxel, y la combinación de Fórmula la 150 mg/kg de docetaxel y 5 mg/kg. A los ratones se les administró docetaxel en el día 1, 5 y 9 (q4d x 3) por vía intravenosa mientras que la fórmula la se dosificó al día durante 21 días por sonda oral.

- 30 La figura 20 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones atímicos CD-1 (Charles River Labs) con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-361.1 a los que se administra en el día 1: vehículo MCT (0,5% metilcelulosa / 0,2% de Tween 80), 100 mg/kg de fórmula la (GDC-0941), 15 mg/kg de docetaxel y la combinación de 100 mg/kg de Fórmula la y 15 mg/kg de docetaxel. Los ratones fueron dosificados por vía intravenosa con docetaxel en el día 0 y el día 11, mientras que la fórmula la se dosificó en los días 0 - 4, 11 - 17 y 21 - 28 mediante sonda oral.

- 35 La figura 21 muestra el cambio de volumen medio del tumor a lo largo del tiempo en ratones atímicos nu/nu hembra NMRI con xenoinjertos de explantes de tumor de mama primario MAXF 1162 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% metilcelulosa / 0,2% de Tween 80), 100 mg/kg de fórmula la (GDC-0941), 15 mg/kg de docetaxel y la combinación de 100 mg/kg de fórmula la y 15 mg/kg de docetaxel. Los ratones fueron dosificados por vía intravenosa con docetaxel en los días 0, 11, 22 y 44 y la fórmula la se dosificó en los días 0 - 5, 11 - 16, 22 - 27, 30 - 40 32, 42 y 44 por sonda oral.

- 45 La figura 22 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo en ratones nu/nu (atímicos) hembra CRL con xenoinjertos tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) NCI-H2122 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% de metilcelulosa / 0,2% de Tween 80), 50 mg/kg de fórmula la (GDC-0941), 75 mg/kg de erlotinib y la combinación de 50 mg/kg de fórmula la y 75 mg/kg de erlotinib. A los ratones se les administró al día erlotinib y fórmula la al día durante 16 días por sonda oral.

- 50 La figura 23 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra HRLN con xenoinjertos de células tumorales de mama MCF-7 (mutante PI3K) dosificados en el día 0 con: vehículo MCT y PBS (MCT; 0,5% de metilcelulosa/ 0,2% de Tween 80 y PBS; solución salina tamponada con fosfato), IgG testigo o de control 5 mg/kg, mB20-4.1 murino anti-VEGF 5 mg/kg, Fórmula la (GDC-0941) 150 mg/kg, y la combinación de fórmula la 150 mg/kg y mB20-4.1 murino anti-VEGF 5 mg/kg. Los animales fueron dosificados con IgG control y mB20-4.1 por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas y con Fórmula la al día durante 21 días por alimentación oral forzada y el crecimiento tumoral se controló durante un 41 días más (el número total de días en el estudio fue de 62). La fórmula la y mB20-4.1 fueron coadministrados simultáneamente.

- 55 La figura 24 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo con nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de glioma U87MG dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 109 mg/kg, temozolomida 100 mg/kg, y la combinación de Fórmula la 109 mg/kg y temozolomida 100 mg/kg, junto con ratones

que no recibieron ningún fármaco (grupo sin tratamiento). Los animales fueron dosificados con la fórmula por vía oral al día durante 21 días, y temozolomida por vía oral al día durante 5 días.

La figura 25 muestra el cambio de volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos CD-1 con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-361.1 dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 150 mg/kg, gemcitabina 100 mg/kg, y la combinación de fórmula la 150 mg/kg y 100 mg/kg de gemcitabina, junto con los ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). Los animales fueron dosificados con fórmula la por vía oral al día durante 21 días, y gemcitabina intraperitoneal en los días 1, 4, 7 y 10 (q3d x 4).

La figura 26 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama BT474 dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) a los 18, 36, y 73 mg/kg, trastuzumab 20 mg/kg, y las combinaciones de la fórmula la en 18, 36, y 73 mg/kg y trastuzumab 20 mg/kg, junto con los ratones que no recibieron fármacos (grupo del vehículo). Los animales fueron dosificados con fórmula la por vía oral al día durante 21 días, y trastuzumab por vía intravenosa dos veces por semana durante 3 semanas.

La figura 27 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama BT474 dosificados en el día 0 con: fórmula lb en 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula lb en 2,5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula lb en 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, trastuzumab 15 mg/kg por vía intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb en 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas; fórmula lb en 2,5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas; y fórmula lb en 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intravenosa una vez a la semana durante 3 semanas, junto con los ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 28 muestra el cambio de volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama MCF-7 dosificados en el día 0 con: anticuerpo murino anti-VEGF B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula lb a 10 mg/kg por vía oral al día durante 4 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante los días 0 - 3, 10 - 26, fórmula lb a 2 mg/kg por vía oral al día durante los días 0 - 4, 10 - 25, y las combinaciones de: fórmula lb en 10 mg/kg por vía oral al día durante 4 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula lb en 5 mg/kg por vía oral al día durante los días 0 - 3, 10 - 26 y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; y fórmula lb a 2 mg/kg por vía oral al día durante días 0 - 4, 10 - 25 y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, junto con los ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 29 muestra el cambio de volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama Fo5 dosificados en el día 0 con: anticuerpo murino anti-VEGF B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 36 y 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 2,5 y 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de: fórmula la a 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula la a 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 30 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-231, dosificados en el día 0 con: anticuerpo anti-VEGF murino B20-4.1 5 mg/kg vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 36 y 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 8 días, y las combinaciones de: fórmula la a 36 mg/kg al día por vía oral durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula la a 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; y fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 8 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 1,5 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 31 muestra el cambio de volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) H1299 dosificados en el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la (GDC-0941) a 100 mg/kg por vía oral al día durante 6 días, fórmula la 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la 25 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 6 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 6 días; fórmula la 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante

21 días; y fórmula la 25 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 32 muestra el cambio de volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) H520 dosificados en el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la (GDC-0941) a 73 mg/kg por vía oral al día durante 4 días, fórmula la a 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la 18 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de fórmula la 73 mg/kg por vía oral al día durante 4 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 4 días; fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días; y fórmula la 18 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármacos (grupo del vehículo).

La figura 33 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) H1299 dosificados en el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas; y fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 34 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos hembra Taconic NCR con xenoinjertos de células de cáncer de pulmón no microcíticas (NSCLC) NCI-H2122 dosificados en el día 0 con: erlotinib 75 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, y las combinaciones de: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 16 días; y la fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 35 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de melanoma humano A375 dosificados en el día 0 con: PD-0325901 3 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, y la combinación de: PD-0325901 3 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y temozolomida 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 36 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de melanoma humano A375, dosificados en el día 0 con: temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días, fórmula lb a 10 mg/kg por vía oral una vez a la semana durante 3 semanas, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb a 10 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días; y fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 37 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de ovario humano SKOV3 dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, la fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, docetaxel 10 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula la 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; y fórmula la 73 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 38 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de ovario humano SKOV3 dosificados en el día 0 con: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula lb 1 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; y fórmula lb 1 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

La figura 39 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células humanas tumorales de cáncer de ovario SKOV3 dosificados en el día 0 con: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas, fórmula lb 10 mg/kg por vía oral a la semana durante 3 semanas,

docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

- 5 La figura 40 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos beige SCID hembra con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata primario humano Lucap 35V dosificados en el día 0 con: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d X 3), fórmula la (GDC-0941) 50 mg/kg por vía oral al día durante 18 días, fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 18 días, y las combinaciones de: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d X 3) y fórmula la 50 mg/kg por vía oral al día durante 18 días y docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d X 3) y fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 18 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo).

- 10 La figura 41 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos SCID Beige hembra con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata primario humano Lucap 35V dosificados el día 0 con: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d X 3), fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días, fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días, y las combinaciones de: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) y fórmula lb 2,5 mg kg por vía oral al día durante 15 días y docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa en los días 1, 5 y 9 (q4d X 3) y fórmula lb 5 mg kg por vía oral al día durante 15 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo).

- 15 La figura 42 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra CRL con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata humano primario NCI-PC3 dosificados en los días 1, 5, 9, y 13 (q4d X 4) con: docetaxel 2,5 mg/kg por vía intravenosa, fórmula lb 10 mg/kg por vía oral en los días 1, 5, 9 y 13 (q4D X 4), y la combinación de: docetaxel 2,5 mg/kg por vía intravenosa y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral en los días 1, 5, 9 y 13 (q4d X 4), junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

- 20 La figura 43 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra CRL con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata primario humano PC3-NCI dosificados en el día 0 con: gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces, fórmula la (GDC-0941) 150 mg/kg por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces, fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces, fórmula lb 5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces, y las combinaciones de: gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula la 150 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces; gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces, gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral cada 3 días durante 4 veces, junto con los ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo).

- 25 La figura 44 muestra el cambio medio del volumen del tumor a lo largo del tiempo con ratones atímicos hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales NCI-H2122 (K-ras) NSCLC dosificados en el día 0 con: PD-0325901 6,3 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la (GDC-0941) a 100 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y la combinación de: PD-0325901 6,3 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y fórmula la a 100 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo).

Descripción detallada de realizaciones ejemplares

- 30 Ahora se hará referencia con detalle a ciertas realizaciones de la invención, los ejemplos de las cuales se ilustran en las estructuras y fórmulas que se acompañan. En el caso de que uno o más de la bibliografía incorporada, patentes y materiales similares difiera o esté en contradicción con esta solicitud, incluyendo pero sin limitarse a los términos definidos, uso de plazo, técnicas descritas, o similares, controla esta solicitud.

Definiciones

- 35 Se entiende que las palabras "comprenden", "que comprende (comprendiendo)", "incluyen", "que incluye (incluyendo)" e "incluye", cuando se usan en esta memoria descriptiva y reivindicaciones, especifican la presencia de características establecidas, números enteros, componentes, o etapas, pero no se oponen a la presencia o adición de una o más de otras características, números enteros, componentes, etapas, o grupos de los mismos.

- 40 Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el crecimiento, desarrollo o propagación de cáncer. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a ellos, el alivio de síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad, y la remisión (ya sea parcial o total), detectable o indetectable. "Tratamiento" puede también significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que están en

necesidad de tratamiento incluyen los que están ya con la condición o el trastorno, así como aquellos propensos a tener la condición o el trastorno o aquellos en los que la condición o trastorno debe prevenirse.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que (i) trata la enfermedad, condición o trastorno en particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, condición o trastorno en particular, o (iii) previene o retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, condición o trastorno en particular descrito en el presente texto. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento del tumor; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR: Reaction Rate).

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o tumores malignos linfoides. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer microcítico de pulmón o de células pequeñas, cáncer de pulmón no microcítico ("NSCLC"), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto biológico (molécula grande) o químico (molécula pequeña) útil en el tratamiento del cáncer, al margen del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a ellos: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides vegetales antimitosis, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de la topoisomerasa, proteínas, anticuerpos, fotosensibilizadores, e inhibidores de cinasa. Los agentes quimioterapéuticos incluyen compuestos utilizados en la "terapia dirigida" y la quimioterapia convencional no dirigida.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm), docetaxel (Taxotere®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS N° 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (N° CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), N° CAS 15663-27-1), carboplatino (N° CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), pertuzumab (OMNITARG®, rhuMab 2C4, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien-9-carboxamida, N° CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), doxorubicina (ADRIAMYCIN), Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib (TYKERB®, Glaxo SmithKline).

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, SANOFI), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de MEK, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de MEK, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), ABT-869 (inhibidor multidirección de la familia de VEGF y PDGF receptores de tirosina cinasas, Abbott Laboratories y Genentech), ABT-263 (Bcl-2/Bcl-inhibidor-xL, Abbott Laboratories y Genentech), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorin (ácido folínico), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA®, Johnson & Johnson), capecitabina (XELODA®, Roche), ABRAXANE® (libre de Cremophor), formulaciones de nanopartículas construidas de albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clonafazina, clorofosfamida, estramustina,

ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina hidrocloreto, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediyne (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma11, caliqueamicina omega11, dinemicina, dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de enediyne de cromoproteína relacionada), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, caminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, flouxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxate; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; teniposide; edatraxato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico": (i) los agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas sobre tumores, tales como anti-estrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina); (ii) inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestanie, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA (letrozol; Novartis), y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) los antiandrógenos como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano de nucleósido citosina); (iv) inhibidores de proteína cinasa tales como inhibidores de MEK (WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido cinasa; (vi) oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación aberrante de células, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, como oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de la topoisomerasa 1, tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes anti-angiogénicos como el bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados de cualquiera de los anteriores aceptables farmacéuticamente.

También se incluyen en la definición de "agente quimioterapéutico" los anticuerpos terapéuticos tales como alemtuzumab (Campath), el bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG®, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixa), y el conjugado de fármaco anticuerpo, gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

Los anticuerpos monoclonales humanizados con potencial terapéutico como agentes quimioterapéuticos en combinación con los inhibidores de PI3K de las presentes fórmulas Ia y Ib incluyen: alemtuzumab, apolizumab, aselizumab, atlizumab, bapineuzumab, bevacizumab, bivatzumab, mertansine, cantuzumab, mertansine, cedelizumab, certolizumab pegol, cidfusituzumab, cidtuzumab, daclizumab, eculizumab, efalizumab, epratuzumab, erlizumab, felvizumab, fontolizumab, gemtuzumab ozogamicina, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab, labetuzumab, lintuzumab, matuzumab, mepolizumab, motavizumab, motovizumab, natalizumab, nimotuzumab, nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, omalizumab, palivizumab, pascolizumab, pecfusituzumab, pectuzumab, pertuzumab, pexelizumab, ralvizumab, ranibizumab, reslizumab, resyvizumab, rovelizumab, ruplizumab, sibtrozumab, sipilizumab, sontuzumab, tetraxetan tacatuzumab, tadocizumab, talizumab, tefibazumab, tocilizumab, toralizumab, trastuzumab, tucotuzumab, celmoleukin, tucusituzumab, umavizumab, urtoxazumab, y visilizumab.

El término "mamífero" incluye, pero no se limita a ellos, seres humanos, ratones, ratas, cobayas, monos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y aves de corral.

Un "metabolito" es un producto producido por el metabolismo en el cuerpo, de un compuesto especificado o una sal del mismo. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas rutinarias conocidas en este campo y sus actividades se pueden determinar usando pruebas tales como las descritas en el presente texto. Tales productos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, la reducción, la hidrólisis, la amidación, la desamidación, la esterificación, la desesterificación, la segmentación enzimática, y similares, del compuesto administrado. En consecuencia, la invención incluye metabolitos de compuestos de la invención, incluyendo compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de esta invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para dar un producto metabólico del mismo.

La expresión "prospecto anexo al envase" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

La frase "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente texto, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Entre las sales ejemplares se incluyen, pero sin limitarse a ellas, las sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro ión contrario. El ión contrario puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabiliza la carga en el compuesto progenitor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en que múltiples átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples iones contrarios. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más iones contrarios.

Una sal farmacéuticamente aceptable deseada de un compuesto de fórmula Ia o Ib puede prepararse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo el tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido metanosulfónico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido maleico, ácido succínico, ácido mandélico, ácido fumárico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, un ácido piranosidilo, tal como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un alfa hidroxí ácido, tal como ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático, tal como ácido benzoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico, tal como ácido p-toluenosulfónico o ácido etanosulfónico, o similares. Los ácidos que generalmente se consideran adecuados para la formación de sales farmacéuticamente útiles o aceptables a partir de compuestos farmacéuticos básicos, se discuten, por ejemplo, en P. Stahl et al, Camille G. (eds.) Handbook of Pharmaceutical Salts. Properties, Selection and Use. (2002) Zurich: Wiley-VCH; S. Berge et al, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66 (1) 1 19; P. Gould, International J. of Pharmaceutics (1986) 33 201 217; Anderson et al., The Practice of Medicinal Chemistry (1996), Academic Press, Nueva York; Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton Pa; y en The Orange Book (Food & Drug Administration, Washington, DC en su página web). Estas descripciones se incorporan al presente texto por referencia al mismo.

Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto ácido puede prepararse por cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, tal como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino o un hidróxido de metal alcalinotérreo, o similares. Los ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a ellas, sales orgánicas derivadas de aminoácidos, tales como glicina y arginina, amoníaco, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas, tales como piperidina, morfina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio.

La frase "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o la composición deben ser compatibles químicamente y/o toxicológicamente con los otros ingredientes que comprende una formulación, y/o el mamífero que está siendo tratado con la misma.

Un "solvato" se refiere a una asociación física o complejo de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Los compuestos de la invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos incluyen, pero no se limitan a ellos, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina. El término "hidrato" se refiere al complejo en el que la molécula de disolvente es agua. Esta asociación física implica grados variables de unión iónica y covalente, incluyendo enlaces de hidrógeno. En ciertos casos, el solvato será capaz de aislamiento, por ejemplo cuando una o más moléculas de disolvente se incorporan en el entramado cristalino del sólido cristalino. La preparación de solvatos se conoce de un modo general, por ejemplo, M. Caira et al, J. Pharmaceutical Sci., 93 (3), 601 611 (2004). Preparaciones similares de solvatos, hemisolvato, hidratos y similares se describen en E. C. van Tonder et al, AAPS

PharmSciTech, 5 (1), artículo 12 (2004); y A. L. Bingham et al, Chem. Commun., 603 604 (2001). Un procedimiento típico, no limitante, implica disolver el compuesto de la invención en cantidades deseadas del disolvente deseado (orgánico o agua o mezclas de los mismos) a una temperatura superior a la ambiente, y enfriar la solución a una velocidad suficiente para formar cristales que son después aislados por métodos estándar. Las técnicas analíticas tales como, por ejemplo, espectroscopía de I. R., muestran la presencia del disolvente (o agua) en los cristales como un solvato (o hidrato).

El término "sinérgico" como se usa en el presente texto se refiere a una combinación terapéutica que es más efectiva que los efectos aditivos de los dos o más agentes individuales. Una determinación de una interacción sinérgica entre un compuesto de fórmula I o II, y uno o más agentes quimioterapéuticos puede basarse en los resultados obtenidos de los ensayos descritos en el presente texto. Los resultados de estos ensayos se analizan usando el método de combinación de Chou y Talalay y Análisis Dosis-Efecto con software Calcsyn, con el fin de obtener un índice de combinación (Chou y Talalay, 1984, Adv Enzyme Regul 22: 27 - 55). Las combinaciones proporcionadas por esta invención se han evaluado en varios sistemas de ensayo, y los datos se pueden analizar utilizando un programa estándar para cuantificar sinergia, aditvismo y antagonismo entre agentes anticancerosos. El programa utilizado preferentemente es el descrito por Chou y Talalay, en "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, Capítulo 2. Los valores del Índice de Combinación inferiores a 0,8 indican sinergia, los valores superiores a 1,2 indican antagonismo y valores entre 0,8 a 1,2 indican efectos aditivos. La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y resultar "sinérgica", es decir, el efecto alcanzado cuando los ingredientes activos usados juntos es superior a la suma de los efectos que resultan del uso separado de los compuestos. puede alcanzarse un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos son: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternancia, puede alcanzarse un efecto sinérgico cuando los compuestos son administrados o suministrados secuencialmente, p. ej. mediante inyecciones diferentes en jeringuillas distintas. En general, durante la terapia de alternancia se administra una dosificación efectiva de cada ingrediente activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación las dosis efectivas de dos o más ingredientes activos se administran juntas.

Preparación de compuestos

Los compuestos de fórmula Ia y Ib pueden ser sintetizados por las rutas de síntesis descritas en los ejemplos. Estas incluyen procesos análogos a los bien conocidos en la técnica química, e incluyendo el documento WO 2006/046031. Los materiales de partida son generalmente disponibles de fuentes comerciales tales como Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) o se preparan con facilidad usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, preparado por métodos descritos generalmente en Louis F. Fieser y Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v. 1-19, Wiley, N. Y. (1967-1999 ed.), o Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, incluyendo suplementos (también disponibles a través de la base de datos en línea de Beilstein).

Los compuestos de fórmula Ia y Ib pueden ser convertidos en una sal farmacéuticamente aceptable, y una sal puede ser convertida en el compuesto de base libre, por métodos convencionales. Los compuestos de fórmula Ia y Ib pueden ser terapéuticamente efectivos como base libre o como sal farmacéuticamente aceptable, dependiendo de las propiedades deseadas tales como solubilidad, disolución, naturaleza higroscópica y farmacocinética. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico y ácido fosfórico; y ácidos orgánicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido etanosulfónico, ácido aspártico y ácido glutámico. La sal puede ser un mesilato, un hidrocloreto, un fosfato, un bencenosulfonato o un sulfato. Las sales pueden ser sales mono o sales bis. Por ejemplo, la sal mesilato puede ser el mono-mesilato o bis-mesilato.

Los compuestos de fórmula Ia y Ib, y sus sales, también pueden existir como hidratos o solvatos.

Métodos de separación

En los métodos de preparación de los compuestos de esta invención, puede ser ventajoso separar unos de otros los productos de reacción y/o de los materiales de partida. Los productos deseados de cada etapa o serie de etapas se separan y/o se purifican (en lo sucesivo se separan) al grado de homogeneidad deseado mediante las técnicas comunes en este campo. Típicamente tales separaciones implican la extracción multifase, cristalización en un disolvente o una mezcla de disolventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede implicar cualquier número de métodos que incluyen, por ejemplo: fase inversa y fase normal; exclusión de tamaños; intercambio iónico; métodos y aparatos de cromatografía de líquidos de alta, media y baja presión; analítica a escala pequeña; lecho móvil simulado (SMB) y cromatografía en capa fina o gruesa preparativa, así como técnicas de capa fina a pequeña escala y cromatografía rápida.

Otra clase de métodos de separación implica el tratamiento de una mezcla con un reactivo seleccionado para unirse o hacer separable de otra forma un producto deseado, material de partida sin reaccionar, subproducto de la reacción, o similares. Tales reactivos incluyen adsorbentes o absorbentes tales como carbón activado, tamices moleculares, medios de intercambio iónico, o similares. Alternativamente, los reactivos pueden ser ácidos en el caso de un material básico, bases en el caso de un material ácido, reactivos de unión tales como anticuerpos, proteínas de unión, quelantes selectivos tales como éteres corona, reactivos de extracción líquido/líquido de iones (LIX), o similares.

La selección de los métodos de separación apropiados depende de la naturaleza de los materiales implicados. Por ejemplo, punto de ebullición y peso molecular en la destilación y sublimación, presencia o ausencia de grupos funcionales polares en cromatografía, estabilidad de materiales en medios ácidos y básicos en la extracción multifase, y similares. Un experto en la técnica aplicará las técnicas que tengan más probabilidades de lograr la separación deseada.

Las mezclas diastereómeras pueden separarse en sus diastereómeros individuales basándose en sus diferencias fisicoquímicas por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como la cromatografía y/o la cristalización fraccionada. Los enantiómeros pueden separarse convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diastereómera por reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, auxiliar quiral tal como un alcohol quiral o cloruro de ácido de Mosher), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereoisómeros individuales en los correspondientes enantiómeros puros. También, algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser atropisómeros (por ejemplo, bariolos sustituidos) y se consideran parte de esta invención. Los enantiómeros también pueden separarse mediante el uso de una columna de HPLC quiral.

Un estereoisómero individual, por ejemplo, un enantiómero, sustancialmente libre de su estereoisómero se puede obtener por resolución de la mezcla racémica usando un método tal como la formación de diastereómeros usando agentes de resolución ópticamente activos (Eliel, E. y Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994; Lochmuller, C. H., (1975) J. Chromatogr, 113 (3): 283 - 302). Las mezclas racémicas de compuestos quirales de la invención se pueden separar y aislar por cualquier método adecuado, incluyendo: (1) formación de sales diastereómeras iónicas con compuestos quirales y separación por cristalización fraccionada u otros métodos, (2) formación de compuestos diastereómeros con reactivos quirales de derivatización, separación de los diastereómeros y conversión en los estereoisómeros puros, y (3) separación de los estereoisómeros sustancialmente puros o enriquecidos directamente bajo condiciones quirales. Véase: "Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology", Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1993).

Bajo el método (1), las sales diastereómeras pueden formarse por reacción de bases quirales enantioméricamente puras tales como brucina, quinina, efedrina, estricnina, α -metil- β -feniletilamina (anfetamina) y similares, con compuestos asimétricos que llevan funcionalidad ácida, tal como ácido carboxílico y ácido sulfónico. Las sales diastereómeras pueden inducirse para separarse por cristalización fraccionada o cromatografía iónica. Para la separación de los isómeros ópticos de los compuestos amino, la adición de ácidos carboxílicos o sulfónicos quirales, tales como ácido canforsulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico, o ácido láctico, puede tener como resultado la formación de las sales diastereómeras.

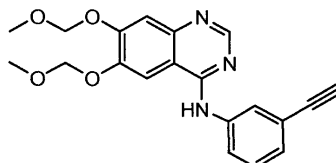
Alternativamente, por el método (2), el sustrato a resolver se hace reaccionar con un enantiómero de un compuesto quiral para formar un par diastereómero (E. y Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., 1994, p. 322). Se pueden formar compuestos diastereómeros haciendo reaccionar compuestos asimétricos con reactivos de derivatización quirales enantioméricamente puros, tales como derivados de mentilo, seguido por la separación de los diastereómeros e hidrólisis para dar el enantiómero puro o enriquecido. Un método de determinación de la pureza óptica implica hacer ésteres quirales, tales como un éster de mentilo, por ejemplo, cloroformiato de (-) mentilo en presencia de una base, o éster de Mosher, acetato de α -metoxi- α - (trifluorometil) fenilo (Jacob III J. Org Chem, (1982) 47: 4165), de la mezcla racémica, y analizar el espectro de ^1H RMN para estudiar la presencia de los dos enantiómeros o diastereómeros atropisoméricos. Los diastereómeros estables de los compuestos atropisoméricos se pueden separar y aislar mediante cromatografía de fase normal e inversa siguiendo métodos para la separación de naftil-isoquinoleínas atropisoméricas (documento WO 96/15111). Por el método (3), se puede separar una mezcla racémica de dos enantiómeros mediante cromatografía utilizando una fase estacionaria quiral ("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W. J. Lough, Ed, Chapman y Hall, Nueva York; Okamoto, J. Chromatogr., (1990) 513: 375 - 378). Los enantiómeros enriquecidos o purificados pueden distinguirse por métodos usados para distinguir otras moléculas quirales con átomos de carbono asimétricos, tales como rotación óptica y dicroísmo circular.

Agentes quimioterapéuticos

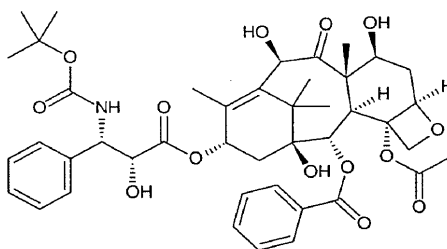
Ciertos agentes quimioterapéuticos han demostrado propiedades sorprendentes e inesperadas en combinación con compuestos de fórmula Ia o Ib en la inhibición de la proliferación de células in vitro e in vivo. Tales agentes

quimioterapéuticos incluyen: erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, y rapamicina.

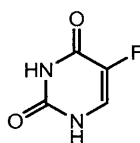
El erlotinib (TARCEVA®, OSI-774, Genentech) se usa para tratar el cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC), cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y otros varios tipos de cáncer dirigiendo específicamente tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (patente de EE. UU. n° 5.747.498; patente de EE.UU. n° 6.900.221; Moyer et al (1997) Cancer Res. 57: 4838; Pollack et al (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 291: 739; Pérez-Soler et al (2004) J. Clin. Oncol. 22: 3238; Kim et al (2002) Curr. Opin. Invest. Drugs 3: 1385 - 1395; Blackhall et al (2005) Expert Opin. Pharmacother. 6: 995 - 1002). El erlotinib se nombra como N-(3-etinilfenil) -6,7-bis (metoximetoxi) quinazolin-4-amina (CAS Reg N° 183321-74-6) y tiene la estructura:



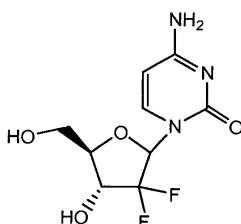
El docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis) se utiliza para tratar cánceres de mama, de ovario, y cáncer NSCLC (patente de EE. UU. n° 4.814.470; patente de Estados Unidos n° 5.438.072; patente de Estados Unidos n° 5.698.582; patente de Estados Unidos n° 5.714.512; patente de EE.UU. n° 5.750.561; Mangatal et al (1989) Tetrahedron 45: 4177; Ringel et al (1991) J. Natl. Cancer Inst. 83: 288; Bissery et al (1991) Cancer Res. 51: 4845; Herbst et al (2003) Cancer Treat. Rev. 29: 407 - 415; Davies et al (2003) Expert. Opin. Pharmacother 4: 553 - 565). El docetaxel se nombra como (2R, 3S)-N-carboxi-3-fenilisoserina, éster de N-terc-butilo, 13-éster con 5,20-epoxi-1,2,4,7,10,13-hexahidroxitax-11-en-9-ona 4-acetato 2-benzoato, trihidrato (patente de Estados Unidos n° 4.814.470; EP 253738; CAS Reg n° 114977-28-5) y tiene la estructura:



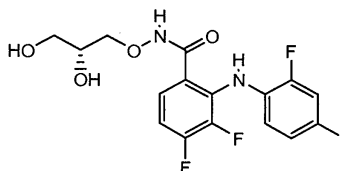
El 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, CAS Reg. No. 51-21-8) es un inhibidor de la timidilato sintasa y ha sido utilizado durante décadas en el tratamiento del cáncer, incluyendo cáncer colorrectal y de páncreas (patente de EE. UU. n° 2.802.005; patente de EE. UU. n° 2.885.396; Duschinsky et al (1957) J. Am. chem. Soc. 79: 4559; Hansen, R. M. (1991) Cancer Invest. 9: 637 - 642). El 5-FU se nombra como 5-fluoro-1H-pirimidina-2,4-diona, y tiene la estructura:



La gemcitabina (GEMZAR®, Lilly, CAS Reg. No. 95058-81-4) es un análogo de nucleósido que bloquea la replicación del ADN, se utiliza para tratar diversos carcinomas incluyendo pancreático, de mama, NSCLC y linfomas (patente de EE. UU. n° 4.808.614; patente de EE. UU. n° 5.464.826; Hertel et al (1988) J. Org. Chem. 53: 2406; Hertel et al (1990) Cancer Res. 50: 4417; Lund et al (1993) Cancer Treat. Rev. 19: 45 - 55). La gemcitabina se nombra como 4-amino-1- [3,3-difluoro-4-hidroxi-5-(hidroximetil) tetrahidrofuran-2-il]-1H-pirimidin-2-ona, y tiene la estructura:

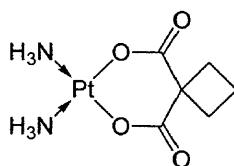


El PD-0325901 (CAS RN 391210-10-9, Pfizer) es un inhibidor de segunda generación, no ATP competitivo, MEK alostérico para el potencial tratamiento oral del cáncer con comprimidos (patente de EE. UU. n° 6.960.614; patente de Estados Unidos n° 6.972.298, documento US 2004/147478, documento US 2005/085550). Se han realizado ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento potencial de tumores de mama, tumores de colon, y melanoma. El PD-0325901 se nombra como (R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino) benzamida, y tiene la estructura:

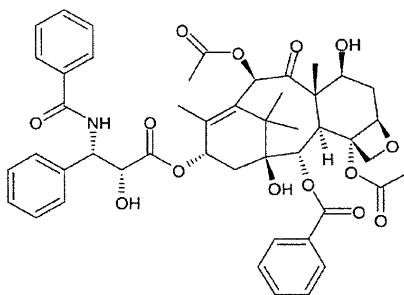


El cisplatino (cis-diamina, dicloroplatino (II), CAS Reg. No. 15663-27-1), es un fármaco quimioterapéutico basado en platino usado para tratar varios tipos de cánceres, incluyendo sarcomas, algunos carcinomas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de ovario), linfomas y tumores de células germinales (Ochs et al (1978) Cancer Treat. Rep. 62: 239; Pinedo et al (1978) Eur. J. Cancer 14: 1149; "Cisplatin, Current Status and New Developments", A. W. Prestayko et al., Eds., Academic Press, Nueva York, 1980). El cisplatino (CDDP) fue el primer miembro de su clase, que ahora incluye también carboplatino y oxaliplatino.

El carboplatino (CAS Reg No. 41575-94-4) es un fármaco quimioterapéutico usado contra el carcinoma de ovario, pulmón, y cánceres de pulmón, cabeza y cuello (patente de EE. UU. n° 4.140.707; Calvert et al (1982) Cancer Chemother. Pharmacol. 9: 140; Harland et al (1984) Cancer Res. 44: 1693). El carboplatino se nombra como azanida; ácido ciclobutano-1,1-dicarboxílico; platino, y tiene la estructura:



El paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton NJ, CAS Reg. No. 33069-62-4) el compuesto es aislado de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*, y es usado para el tratamiento de cáncer de pulmón, ovario, mama, y formas avanzadas de sarcoma de Kaposi (Wani et al (1971) J. Am. Chem. Soc. 93: 2325; Mekhail et al (2002) Expert. Opin. Pharmacother. 3: 755 - 766...). El paclitaxel es nombrado como ácido β- (benzoilamino) -α-hidroxi-, 6,12b-bis (acetiloxi) -12- (benzoiloxi) 2a, 3, 4, 4a, 5, 6, 9, 10, 11, 12,12a, 12b-dodecahidro-4,11-dihidroxi-4a, 8, 13, 13- tetrametil-5-oxo-7,11-metano-1H-ciclodeca (3,4) benz (1,2-b) oxet-9-ilester, (2aR- (2a-α, 4- β, 4a-β, 6- β, 9-α (α-R*, β-S*), 11-α, 12-α , 12a-α, 2b-α))-bencenopropanoico, y tiene la estructura:



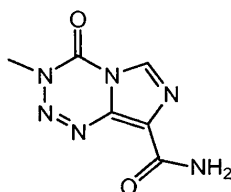
El bevacizumab (AVASTIN®, Genentech) es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante contra VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular (patente de Estados Unidos n° 6.054.297; Presta et al (1997) Cancer Res. 57: 4593 - 4599.). Se usa en el tratamiento del cáncer, donde se inhibe el crecimiento tumoral bloqueando la formación de nuevos vasos sanguíneos. El bevacizumab fue el primer inhibidor de la angiogénesis clínicamente disponible en los Estados Unidos, aprobado por la FDA en 2004 para su uso en combinación con la quimioterapia estándar en el tratamiento de cáncer de colon metastásico y la mayoría de las formas de cáncer de pulmón no microcítico metastásico. Están en curso varios estudios clínicos avanzados para determinar su seguridad y eficacia para los pacientes con: adyuvante/cáncer de colon no metastásico, cáncer de mama metastásico, carcinoma de células renales metastásico, glioblastoma metastásico multiforme, cáncer de ovario metastásico, cáncer de próstata metastásico hormono-refractario, y cáncer de páncreas metastásico o irresecable localmente avanzado (Ferrara et al (2004) Nat. Rev. Drug Disc. 3: 391 - 400).

El bevacizumab incluye regiones marco de IgG1 humana mutadas y regiones determinantes de complementariedad de unión con el antígeno del anticuerpo monoclonal anti-hVEGF murino A.4.6.1 que bloquea la unión del VEGF humano a sus receptores. El bevacizumab tiene una masa molecular de aproximadamente 149.000 daltons y está glicosilado. El bevacizumab y otros anticuerpos anti-VEGF humanizados se describen con más detalle en la patente de EE. UU. n° 6.884.879. Los anticuerpos anti-VEGF adicionales incluyen los anticuerpos de las series G6 o B20, por ejemplo G6-31, B20-4.1, (documento WO 2005/012359, documento WO 2005/044853; patente de EE. UU. n° 7.060.269; patente de EE. UU. n° 6.582.959, patente de EE.UU n° 6.703.020; patente de Estados Unidos n° 6.054.297, documento WO 98/45332, documento WO 96/30046, documento WO 94/10202, documento EP 0666868B1, documento US 2006/009360, documento US 2005/0186208, documento US 2003/0206899, documento US 2003/0190317; documentos 2003/0203409; 20050112126; Popkov et al (2004) Journal of Immunological Methods 288: 149 – 164. Un "anticuerpo de la serie B20" es un anticuerpo anti-VEGF que se deriva de una secuencia del anticuerpo B20 o un anticuerpo derivado de B20 de acuerdo con una cualquiera de las Figs. 27 - 29 del documento WO 2005/012359, cuya descripción en su totalidad se incorpora expresamente en este documento como referencia. En una realización, el anticuerpo de serie B20 se une a un epítipo funcional en el VEGF humano que comprende los restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, y C104. Otros anticuerpos anti-VEGF incluyen aquellos que se unen a un epítipo funcional sobre VEGF humano que comprenden restos F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, y C104 o, alternativamente, que comprenden los restos F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 y Q89.

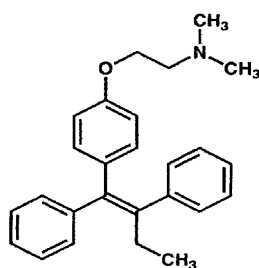
El trastuzumab (HERCEPTIN®, huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Genentech) es una versión de anticuerpo monoclonal, IgG1 kappa humanizado derivado de ADN recombinante, del anticuerpo murino HER2 que se une selectivamente con alta afinidad en un ensayo basado en células (Kd = 5 nM) al dominio extracelular de la proteína del receptor2 del factor de crecimiento epidérmico humano, HER2 (ErbB2) (patente de EE.UU. n° 5.821.337; patente de Estados Unidos n° 6.054.297; patente de Estados Unidos n° 6.407.213; patente de Estados Unidos n° 6.639.055; Coussens L., et al (1985) Science 230: 1132 - 9; Slamon D. J., et al (1989) Science 244: 707 - 12). El trastuzumab contiene regiones marco humanas con las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo murino (4D5) que se unen a HER2. El trastuzumab se une al antígeno HER2 y por tanto inhibe el crecimiento de células cancerosas. Se ha mostrado que el trastuzumab, tanto en ensayos in vitro como en animales, inhibe la proliferación de células tumorales humanas que sobreexpresan HER2 (Hudziak R. M., et al (1989) Mol. Cell Biol. 9: 1165 -72; Lewis G. D., et al (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37: 255 – 63; Baselga J. et al. (1998) Cancer Res. 58: 2825 – 2831). El trastuzumab es un mediador de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, ADCC (Hotelling T. E., et al. (1996) [resumen]. Proc. Annual Meeting Am. Assoc. Cancer Res. 37: 471; Pegram M. D. et al (19997) [resumen]. Proc. Am. Assoc. Cancer Res.; 38: 602; Sliwkowski et al. (1999) Seminars in Oncology 26 (4), Suppl. 12: 60 – 70; Yarden Y. y Sliwkowski, M. (2001) Nature Reviews; Molecular Cell Biology, McMillan Magazines, Ltd., Vol. 2: 127 – 137). El HERCEPTIN® fue aprobado en 1998 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastáticos que sobreexpresan ErbB2 (Baselga et al., (1996) J. Clin. Oncol. 14: 737 – 744). El HERCEPTIN® aprobado por la FDA en 2006 como parte de un régimen de tratamiento que contiene doxorrubicina, ciclofosfamida y paclitaxel para el tratamiento coadyuvante de pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos, positivo a HER2. Hay una necesidad clínica significativa para el desarrollo de más terapias del cáncer dirigidas a HER2 para aquellos pacientes con tumores que sobreexpresan HER2 u otras enfermedades asociadas con la expresión de HER2 que no responden, o responden de forma escasa, al tratamiento con HERCEPTIN®.

El pertuzumab (OMNITARG™, rhuMAb 2C4, Genentech) es un anticuerpo humanizado de estadio clínico, y el primero de una nueva clase de agentes conocidos como inhibidores de la dimerización de HER (IDHs) que bloquean la capacidad del receptor HER2 para colaborar con otros miembros de la familia de receptores HER, es decir, HER1/EGFR, HER3, y HER4 (patente de EE. UU. n° 6.949.245; Agus et al (2002) Cancer Cell 2: 127 - 37; Jackson et al (2004) Cancer Res. 64: 2601 - 9; Takai et al (2005) Cancer 104: 2701 - 8). En las células cancerosas, lo que interfiere con la capacidad de HER2s para colaborar con otros receptores de la familia HER bloquea la señalización de las células y finalmente puede conducir a la inhibición del crecimiento de las células cancerosas y a la muerte de las células cancerosas. Debido a su modo de acción único, los IDHs tienen potencial para trabajar en una amplia variedad de tumores, incluyendo aquellos que no sobreexpresan HER2 (Mullen et al (2007) Molecular Cancer Therapeutics 6: 93 - 100).

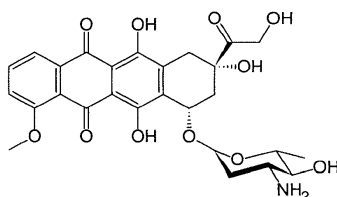
La temozolomida (CAS Reg. No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough) es un fármaco quimioterapéutico oral aprobado por la FDA para el tratamiento del astrocitoma anaplásico, y ha sido estudiado por otros tipos de tumor cerebral, tales como glioblastoma multiforme (patente de EE. UU. n° 5.260.291; Stevens et al (1984) J. Med. Chem. 27: 196; Newlands et al (1997) Cancer Treat. Rev. 23: 35 - 61; Danson et al (2001) Expert Rev. Anticancer Ther. 1: 13 - 19). La temozolomida se nombra como (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien-9-carboxamida o 3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo [5,1-d]-as-tetrazina-8-carboxamida (patente de EE. UU. n° 5.260.291, N° CAS 85622-93-1.), y tiene la estructura:



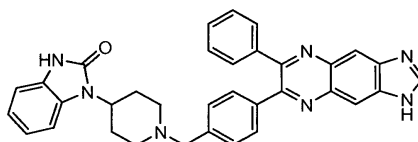
El tamoxifeno (NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) es un modulador del receptor de estrógeno selectivo (SERM) activo por vía oral, que se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama y es actualmente el fármaco de mayor venta en el mundo para esta indicación. El tamoxifeno (Nolvadex) fue aprobado primero por la FDA (ICI Pharmaceuticals, ahora AstraZeneca) en 1977 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico (Jordan V. C. (2006) Br. J. Pharmacol. 147 (Suppl 1): S269 - 76). El tamoxifeno se usa actualmente para el tratamiento del cáncer de mama positivo para el receptor de estrógeno (ER) tanto inicial como avanzado, en mujeres pre- y postmenopáusicas (Jordan V. C. (1993) Br. J. Pharmacol. 110 (2): 507 - 17). También está aprobado por la FDA para la prevención del cáncer de mama en mujeres con alto riesgo de desarrollo de la enfermedad y para la reducción del cáncer de mama contralateral (en la mama opuesta). El tamoxifeno se nombra como (Z) -2- [4- (1,2-difenil-1-enil) fenoxi]-N,N-dimetil-etanamina, (CAS Reg. n° 10540-29-1) y tiene la estructura:



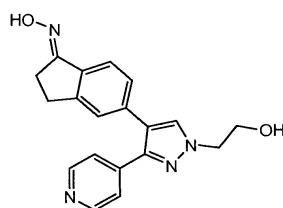
La doxorrubicina (ADRIAMYCIN®, hidroxildaunorrubicina) es un fármaco de interacción con el ADN ampliamente utilizado en quimioterapia desde los años 1960. Es un antibiótico de antraciclina y relacionado estructuralmente con la daunomicina, que también se intercala en el ADN. La doxorrubicina se utiliza comúnmente en el tratamiento de una amplia gama de tipos de cáncer. La doxorrubicina se nombra como (8S, 10S)-10-(4-amino-5-hidroxi-6-metil-tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)-6,8,11-trihidroxi-8-(2-hidroxiacetil)-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-diona, (CAS Reg No. 23214-92-8) y tiene la estructura:



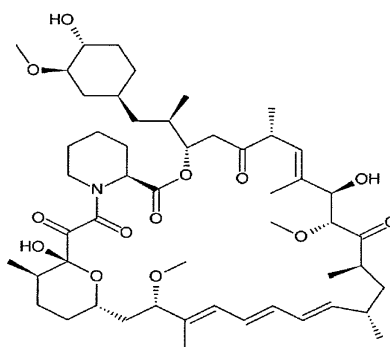
Akti-1/2 es un compuesto de quinoxalina permeable a las células que inhibe de forma potente y selectiva la actividad Akt1/Akt2: IC₅₀ = 58 nM, 210 nM, y 2,12 µM para Akt1, Akt2 y Akt3, respectivamente, en ensayos de cinasa *in vitro* (Barnett et al. (2005) Biochem. J. 385: 399; DeFeo-Jones, et al (2005) Mol. Cancer Ther. 4: 271; Zhao et al (2005) Bioorg. Med. Chem. Lett. 15: 905; Lindsley et al (2005) Bioorg. Med. Chem. Lett. 15: 761, documento US 2006/142178, documento US 2005/159422, documento US 2004/102360). La inhibición parece ser dependiente del dominio de homología a pleckstrin (PH). No muestra ningún efecto inhibitorio frente a Akt3 que carecen del dominio de PH, u otras cinasas de la familia AGC estrechamente relacionadas, PKA, PKC, y SGK, incluso a concentraciones tan altas como 50 µM. Akti-1/2 supera la resistencia mediada por Akt1/Akt2 a agentes quimioterapéuticos en las células tumorales y se demuestra que bloquea la fosforilación/activación basal y estimulada de Akt1/Akt2 tanto en células cultivadas *in vitro* como en ratones *in vivo*. Akti-1/2 (EMD Biosciences Product No. 124018) es nombrado como 1,3-dihidro-1-((1-((4-(6-fenil-1H-imidazo [4,5-g]quinoxalin-7-il) fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, y tiene la estructura:



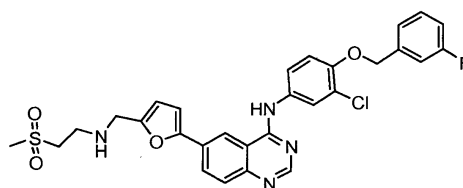
HPPD es un inhibidor de B-Raf selectivo (IC₅₀ de B-Raf < 2 nM, IC₅₀ de pERK 87 nM) bajo investigaciones preclínicas (documento US 2006/0189627). HPPD se nombra como 5-(1-(2-hidroxietil)-3-(piridin-4-il)-1H-pirazol-4-il)-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona, y tiene la estructura:



- 5 La rapamicina (sirolimus, RAPAMUNE®) es un fármaco inmunosupresor utilizado para prevenir el rechazo en el trasplante de órganos, y es especialmente útil en trasplantes de riñón. La rapamicina es un antibiótico macrólido ("micina") descubierta como un producto de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* en una muestra de suelo de una isla llamada Rapa Nui, más conocida como Isla de Pascua (Pritchard DI (2005). Drug Discovery Today 10 (10): 688 - 691). La rapamicina inhibe la respuesta a la interleucina-2 (IL-2) y con ello bloquea la activación de las células T y B.
- 10 El modo de acción de la rapamicina es unir la proteína citosólica *proteína de unión con FK-12* (FKBP12). El complejo de rapamicina-FKBP12 inhibe la ruta de la diana de rapamicina en mamíferos (*mammalian target of rapamycin* (mTOR) a través de la unión directa del Complejo1 de mTOR (mTORC1). mTOR se llama también FRAP (proteína asociada a rapamicina FKBP) o RAFT (rapamicina y diana FKBP). La rapamicina se nombra como (3S, 6R, 7E, 9R, 10R, 12R, 14S, 15E, 17E, 19E, 21S, 23S, 26R, 27R, 34As)-9, 10, 12, 13, 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 32, 33, 34, 34a-hexadecahidro-9,27-dihidroxi-3-[(1R)-2-[(1S, 3R, 4R)-4-hidroxi-3-metoxiciclohexil]-1-metiletil]-10,21-dimetoxi-6, 8, 12, 14, 20, 26-hexametil-23, 27-epoxi-3H-pirido [2,1-c] [1, 4]-oxaazaciclohentriacontina-1, 5, 11, 28, 29 (4H, 6H, 31H)-pentona (CAS Reg No. 53123-88-9), y tiene la estructura:



- 20 El lapatinib (TYKERB®, GW572016, Glaxo SmithKline) ha sido aprobado para su uso en combinación con capecitabina (XELODA®, Roche) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico cuyos tumores sobreexpresan HER2 (ErbB2) y que han recibido tratamiento previo incluyendo una antraciclina, un taxano y trastuzumab. El Lapatinib es un factor de crecimiento epidérmico ATP competitivo (EGFR) e inhibidor de la tirosina cinasa dual HER2/neu (ErbB-2) (patente de EE. UU. nº 6.727.256; patente de EE. UU. nº 6.713.485; patente de EE. UU. nº 7.109.333; patente de EE. UU. nº 6.933.299; patente de EE. UU. nº 7.084.147; patente de EE. UU. nº 7.157.466; patente de EE. UU. nº 7.141.576) que inhibe la autofosforilación del receptor y la activación mediante la unión a la bolsa de unión a ATP del dominio de la proteína cinasa EGFR/HER2. El lapatinib se nombra como N-(3-cloro-4-(3-fluorobenciloxi) fenil)-6-((2-(metilsulfonil)etilamino) metil) furan-2-il)quinazolin-4-amina, y tiene la estructura:



30 Evaluación biológica

Los compuestos de fórmula Ia y Ib se unen específicamente a las isoformas de cinasa PI3 e inhiben la proliferación de células tumorales (documento WO 2006/046031, documento US 2008/0039459, documento US 2008/0076768, documento US 2008/0076758; documento WO 2008/070740; documento WO 2008 / 073785). Se unen a la isoforma p110α a IC₅₀ menores que 1 micromol y muestran una inhibición del crecimiento tumoral in vivo de un solo agente

en modelos de xenoinjertos de ratón. En consecuencia, los compuestos pueden utilizarse para tratar una enfermedad o trastorno procedente de un crecimiento, función o comportamiento anómalos de las células en terapia de combinación, con uno o más agentes quimioterapéuticos.

Los compuestos descritos en el presente texto se prepararon, se caracterizaron y se ensayaron en relación con su actividad de unión de PI3K (Ejemplo 13) y actividad *in vitro* frente a las células tumorales (Ejemplo 14). La gama de actividades de unión de PI3K (IC₅₀) fue menor que 1 nM (uno nanomolar) a aproximadamente 10 µM (diez micromolar). Ciertos compuestos ejemplares de fórmula I y II tienen valores de IC₅₀ de actividad de unión de PI3K menores que 10 nM. Ciertos compuestos de fórmula I y II tienen valores de EC₅₀ de actividad basada en células tumorales menores que 100 nM.

La actividad citotóxica o citostática de los compuestos se midió estableciendo una línea de células tumorales de mamífero en proliferación en un medio de cultivo de células, añadiendo un compuesto, cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días, y midiendo la viabilidad celular (Ejemplo 14). Se usaron ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad, es decir, la proliferación (IC₅₀), la citotoxicidad (EC₅₀), y la inducción de apoptosis (activación de la caspasa). Las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) se midieron para ciertos compuestos ejemplares mediante ensayos que incluyen: permeabilidad de Caco-2, aclaramiento (*clearance*) de hepatocitos, inhibición del citocromo P450, inducción del citocromo P450, unión de proteína plasmática, y obstrucción del canal hERG.

Ensayos de proliferación de células *in vitro*

La potencia *in vitro* de combinaciones terapéuticas de la presente invención como se definen antes se midió por el ensayo de proliferación de células del Ejemplo 14; el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo®, disponible comercialmente de Promega Corp., Madison, WI. Este método de ensayo homogéneo se basa en la expresión recombinante de la luciferasa de *Coleoptera* (patente de EE. UU. n° 5.583.024; patente de EE. UU. n° 5.674.713; patente de EE. UU. n° 5.700.670) y determina el número de células viables en cultivo basado en la cuantificación del ATP presente, un indicador de las células activas metabólicamente (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth 160: 81 - 88; patente de EE. UU. n° 6.602.677). El ensayo CellTiter-Glo® se realizó en formato de 96 o 384 pocillos, que lo hace válido para el cribado automatizado de alto rendimiento (HTS) (Cree et al (1995) Anticancer Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo individual (Reactivo CellTiter-Glo®) directamente a las células cultivadas en medio suplementado con suero. El lavado de células, la eliminación del medio y las múltiples etapas de pipeteado no son necesarios. El sistema detecta una cantidad tan pequeña como 15 células por pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir el reactivo y mezclar.

El formato homogéneo "add-mix-measure (añadir-mezclar-medir)" da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter Glo® genera una señal luminiscente de "tipo resplandor", producida por la reacción con la luciferasa, que tiene una vida mitad generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de células y del medio utilizado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (RLU). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante con la conversión concomitante de ATP en AMP y la generación de fotones. La prolongada vida mitad elimina la necesidad de usar inyectores de reactivo y proporciona flexibilidad para el procesamiento de modo continuo o por tandas de múltiples placas. Este ensayo de proliferación de células se puede utilizar con varios formatos de múltiples pocillos, por ejemplo, formato de 96 o 384 pocillos. Los datos pueden ser registrados por un dispositivo de luminómetro o imágenes por cámara CCD. La salida de luminiscencia se presenta como unidades luminosas relativas (RLU), medidas a lo largo del tiempo.

Los efectos anti-proliferativos de las combinaciones de compuestos fórmula Ia y Ib con agentes quimioterapéuticos se midieron por medio del ensayo CellTiter-Glo® (Ejemplo 14) frente a las líneas de células tumorales en la Figura 1-A y 1-B. Se establecieron valores de EC₅₀ para los compuestos y combinaciones ensayados. La gama de actividades de potencia de células *in vitro* fue de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 µM.

La figura 1-A muestra un resumen de los ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ia y varios agentes quimioterapéuticos. La figura 1-B muestra un resumen de los ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ib y varios agentes quimioterapéuticos. Las líneas de células de cáncer se caracterizan por el tipo de tumor y la presencia de mutación génica.

Los valores de EC₅₀ medidos individuales frente a la célula particular de los compuestos de fórmula Ia y Ib, y del agente quimioterapéutico se comparan con el valor EC₅₀ de la combinación. La puntuación del índice de combinación (CI) se calcula por el método de Chou y Talalay (Chou, T. y Talalay, P. (1984) Adv. Enzyme Regul. 22: 27 - 55). Un CI de menos de 0,8 indica sinergia. Un CI entre 0,8 y 1,2 indica aditividad. Un CI mayor que 1,2 indica antagonismo. Los valores de CI en las figuras 1-A y 1-B son procedentes de las concentraciones EC₅₀ (tercer punto a partir de la derecha). La fuerza de sinergia se evalúa de acuerdo con Chou y Talalay y se expone en la última

columna de las tablas. Ciertas combinaciones en las figuras 1-A y 1-B muestran la sorprendente e inesperada propiedad de sinergia en los ensayos de proliferación de células in vitro con líneas de células de tipo tumoral incluyendo cáncer de mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, páncreas y próstata. Otras combinaciones en las Figs. 1-A y 1-B no muestran sinergia; y sólo muestran mera aditividad o antagonismo.

5 Ciertas combinaciones son sinérgicas con uno o más tipos de tumores, pero no otras. La sinergia demostrada en los ensayos de proliferación de células in vitro proporciona una base para esperar una sinergia correspondiente en el tratamiento de cánceres incluyendo, pero sin limitarse a ellos, de mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, páncreas, y próstata en pacientes humanos.

10 La figura 2 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre distintas concentraciones (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de 5-FU, el compuesto de fórmula Ia, y la combinación de 5-FU y fórmula Ia. Las células MDA-MB-361 (tipo de tumor de mama) se tratan simultáneamente (parte superior), se pre-dosifican con fórmula IA 4 horas antes de la dosificación con 5-FU (medio), y se post-dosifican con fórmula IA 4 horas después de la dosificación con 5-FU (abajo). Se observa una sinergia intensa con dosificación simultánea (CI = 0,11) y después de la dosificación con la fórmula Ia (CI = 0,10). Se
15 observa un efecto intenso del orden de dosificación (secuencia). La predosificación con fórmula Ia mostró menos sinergia (CI = 0,67).

La figura 3 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4 X EC50) de derecha a izquierda de gemcitabina, compuesto de fórmula Ia, y la combinación de gemcitabina y fórmula Ia. Las células Cal-51 (tipo de
20 tumor de mama) se tratan simultáneamente (arriba), y se post-dosifican con fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con gemcitabina (abajo). Se observó sinergia con la administración simultánea (CI = 0,59) y una fuerte sinergia con la post-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,17).

La figura 4 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de gemcitabina, compuesto de fórmula Ia, y la combinación de gemcitabina y fórmula Ia. Las células MDA-MB-361 (tipo
25 de tumor de mama) se tratan simultáneamente (parte superior), se pre-dosifican con la fórmula IA 4 horas antes de la dosificación con gemcitabina (medio), y se post-dosifican con fórmula IA 4 horas después de la dosificación con gemcitabina (parte inferior). Se observó sinergia con la dosificación simultánea (CI = 0,27), pre-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,46), y post- dosificación con fórmula Ia (CI = 0,28).

La figura 5 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de erlotinib, compuesto de fórmula Ia, y la combinación de erlotinib y fórmula Ia. Las células A549 (tipo de tumor de pulmón, con G12C K-ras) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula IA 4 horas antes de la dosificación con erlotinib (medio), y se post-dosifican con fórmula IA 4 horas después de la dosificación con erlotinib
35 (abajo). La sinergia se observó con la administración simultánea (CI = 0,17), pre-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,31), y después de la dosificación con la fórmula Ia (CI = 0,33).

La figura 6 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de erlotinib, compuesto de fórmula Ia, y la combinación de erlotinib y fórmula Ia. Las células H23 (tipo de tumor de pulmón, con la mutación G12C K-ras) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula IA 4 horas antes de la dosificación con erlotinib (medio), y se post-dosifican con fórmula IA 4 horas después de la dosificación con erlotinib (abajo). La sinergia se observa con la dosificación simultánea (CI = 0,28), pre-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,39), y post- dosificación con fórmula Ia (CI = 0,37).

La figura 7 muestra resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de temozolomida, compuesto de fórmula Ia, y la combinación de temozolomida y fórmula Ia. Las células U87 (tipo de tumor glioma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se post-dosifican con fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior). La sinergia se observa con la administración simultánea (CI = 0,004), pero no con la pre-dosificación con fórmula Ia (CI = 1,13), y la post-dosificación con la fórmula Ia (CI = 1,41).
50

La figura 8 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4 X EC50) de derecha a izquierda de temozolomida, compuesto de fórmula Ia, y combinación de temozolomida y fórmula Ia. Las células A375 (tipo de tumor melanoma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se post-dosifican con la fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior). La sinergia se observó con la dosificación simultánea (CI = 0,007), pero no con la pre-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,99), y post-dosificación con fórmula Ia (CI = 1,02).
55

- La figura 9 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4X EC50) de derecha a izquierda de temozolomida, compuesto de fórmula Ia, y combinación de temozolomida y fórmula Ia. Las células MALME-3M (tipo de tumor melanoma) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con temozolomida (medio), y se post-dosifican con fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con temozolomida (parte inferior). La sinergia se observó con la administración simultánea (CI = 0,18), pero no con predosificación con la fórmula Ia (CI = 1,46), y después de la dosificación con fórmula Ia (CI = 1,22).
- La figura 10 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4 × EC50) de derecha a izquierda de doxorubicina, compuesto de fórmula Ia, y combinación de doxorubicina y fórmula Ia. Las células SKOV3 (tipo de tumor de ovario) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con doxorubicina (medio), y se post-dosifican con fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con doxorubicina (parte inferior). La sinergia se observa con la dosificación simultánea (CI = 0,39), y post-dosificación con fórmula Ia (CI = 0,18), pero no con pre-dosificación con la fórmula Ia (CI = 1,44).
- La figura 11 muestra los resultados de ensayos de proliferación de células in vitro (Cell-Titer Glo, Promega) que miden células viables sobre concentraciones variables (partiendo de 4 X EC50) de derecha a izquierda de docetaxel, compuesto de fórmula Ia, y combinación de docetaxel y fórmula Ia. Las células PC3 (tipo de tumor de próstata) se tratan simultáneamente (parte superior), se predosifican con la fórmula Ia 4 horas antes de la dosificación con docetaxel (medio), y se post-dosifican con fórmula Ia 4 horas después de la dosificación con docetaxel (parte inferior). La sinergia se observó con la administración simultánea (CI = 0,43), y después de la dosificación con la fórmula Ia (CI = 0,30), pero no con la pre-dosificación con la fórmula Ia (CI = 1,23).
- La correlación entre las mutaciones Ras y los efectos de sinergia in vitro que se exponen en la Figura 1A (Exp. 1 – 248) debida a combinaciones de compuesto de fórmula Ia y agentes quimioterapéuticos, pueden presentarse mediante gráficas de puntos. Cada punto en las figuras 15 y 16 es un experimento de la figura 1A. Los experimentos están agrupados como Ras de tipo silvestre (Ras WT: wild type) o Ras mutante (Ras mut) con las mutaciones específicas anotadas en la figura 1A, se representan gráficamente frente al efecto sinérgico (Índice de Combinación, CI), en el que la sinergia aumenta al disminuir el CI calculado con el método de Chou y Talalay (Chou, T. y Talalay, P. (1984) *Adv. Enzyme Regul.* 22: 27 – 55).
- La figura 12 muestra un gráfico de puntos de sinergia (índice de combinación) de experimentos con erlotinib y compuesto de fórmula Ia de la figura 1A frente a líneas de células tumorales con y sin mutaciones Ras (Expts. 71 - 73, 140 - 168, 230 - 231). Las líneas de células mutantes ras muestran una sinergia más intensa entre erlotinib y compuesto de fórmula Ia que las líneas de células ras de tipo silvestre.
- La figura 13 muestra un gráfico de puntos de sinergia (índice de combinación) de experimentos con PD-0325901 y compuestos de fórmula Ia a partir de la figura 1A frente a líneas de células tumorales con y sin mutaciones Ras (Expts. 29 - 35, 74 - 83, 124 - 139, 175 - 184, 224 - 226, 232 - 236, 247, 248). Las líneas de células mutantes ras muestran una sinergia más intensa entre PD-0325901 y el compuesto de fórmula Ia que las líneas de células ras de tipo silvestre.
- La figura 14 muestra los resultados a lo largo del tiempo del tratamiento de una línea de células tumorales sinérgica MDA-MB-361 y una línea de células tumorales no sinérgica MT-3 con gemcitabina a niveles de dosificación EC80. Los niveles pAkt se midieron a T = 0 (no tratado, UT (UnTreated)), y al cabo de 1 hora, 4 horas, 6 horas y 24 horas. Se sabe que la actividad de Akt constitutiva e inducible promueve la resistencia a la quimioterapia, trastuzumab, o tamoxifeno en células de cáncer de mama (Clark et al (2002) *Mol. Cancer Ther.* 1 (9): 707 - 17). Los niveles de fosfo Akt (pAkt) se pueden medir por el método descrito en el Ejemplo 18. El CI bajo se correlaciona con el efecto de la quimioterapia para inducir un aumento en pAkt. Los niveles de pAkt (Ser473) se determinaron usando kits de esferas de Biosource (Carlsbad, CA) y el sistema Luminex Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA). El tratamiento con gemcitabina conduce al aumento de los niveles de pAkt en la línea celular sinérgica (MDA-MB-361), pero no en la línea celular no sinérgica (MT-3), lo que demuestra que un aumento en los niveles de pAkt en respuesta a la quimioterapia está correlacionado y es predictivo de sinergia por un compuesto de fórmula Ia o Ib y un agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer.
- La figura 15 muestra un gráfico de puntos de experimentos de sinergia (índice de combinación) de docetaxel, 5-FU o gemcitabina y compuestos de fórmula Ia a partir de la figura 1A frente a líneas de células tumorales que muestran un aumento de pAkt o ningún aumento de pAkt en respuesta al agente quimioterapéutico solo. Las líneas de células que muestran un aumento en pAkt después del tratamiento con docetaxel, 5-FU, o gemcitabina muestran sinergia más intensa con el compuesto de fórmula Ia que las líneas de células sin una respuesta pAkt.
- Un método para la determinación de compuestos para ser usados en combinación para el tratamiento del cáncer comprende: a) administrar una combinación terapéutica de un compuesto que tiene la fórmula Ia o Ib, y un agente quimioterapéutico seleccionado entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD,

rapamicina, y lapatinib a una línea de células tumorales in vitro con una mutación K-ras, y b) medir un efecto sinérgico o no sinérgico

Aunque pueden ser operativos otros mecanismos de acción en las combinaciones ejemplificadas en las figuras 1A, 1B, y las figuras 2 - 11, los resultados son consistentes con inhibidores de PI3K que ejercen un efecto específico de la fase G1 en la inhibición de la proliferación de células tumorales, 5FU que ejerce una interrupción específica de la fase S de la síntesis de ADN, gemcitabina que ejerce una interrupción específica de la fase S de la síntesis de ADN, y docetaxel que ejerce una despolarización específica de la fase M de los microtúbulos.

Citometría de flujo FACS

Se llevó a cabo citometría de flujo para medir los efectos de la terapia de combinación de compuesto de fórmula la y varios agentes quimioterapéuticos sobre células tumorales de tumores de mama MB3 y de próstata PC3. El ensayo Anexina V/PI detecta eventos apoptóticos tempranos y tardíos (Ejemplo 15). Las células que son positivas a anexina V están en las etapas tempranas de la apoptosis y las que son a la vez positivas a anexina V y al PI se anotan como "muertas" en las cartas del gráfico de barras de la figura 19. Las células restantes constituyen la población "viva".

La figura 16 muestra los resultados de la citometría de flujo FACS (clasificador celular activado por fluorescencia): (arriba) las células MB361 son (de izquierda a derecha) no tratadas, tratadas con fórmula la, 5FU, y primero con 5FU, después compuesto de fórmula la; (medio) células PC3 son (de izquierda a derecha) no tratadas, tratadas con fórmula la, docetaxel, simultáneamente con compuesto de fórmula la y docetaxel, primero con fórmula la después con docetaxel, y primero con docetaxel, después con fórmula la; y (abajo) las células MB361 son (de izquierda a derecha) no tratadas, tratadas con fórmula la, gemcitabina, y primero con gemcitabina luego con fórmula la.

El compuesto de fórmula la y un agente genotóxico quimioterapéutico se dosificaron a EC80 durante 24, 48, 72 horas. FACS (fijado para ciclo celular (PI), células vivas para anexina V y PI) Los compuestos se añadieron, bien simultáneamente o separados por 4 horas, pre-dosificación y post-dosificación con compuesto de fórmula la (Ejemplo 19). Se observó un efecto de lavado cuando se alcanzó la sinergia máxima al cabo de una hora. Las combinaciones se mantuvieron sinérgicas con ambos fármacos lavados una hora después de la dosificación. Hay aumentos en la apoptosis temprana y tardía en las tres combinaciones (Figura 16) cuando la fórmula la se combina con el fármaco quimioterapéutico. Un valor de CI de Chou y Talalay bajo sugiere que es probable un beneficio significativo en la inhibición del tumor cuando estos fármacos se combinan in vivo.

Ensayo de combinación tridimensional

En los tejidos glandulares, como el tejido de mama, el epitelio interactúa con una forma especializada de matriz extracelular, conocida como membrana basal. La matriz extracelular regula la biología y la patogénesis de la glándula mamaria normal. La adaptación de una membrana basal rica en laminina reconstituida (IrBM) al cultivo celular estándar puede recapitular la arquitectura acinar básica de la glándula mamaria y se considera que es un modelo in vitro mejorado para simular el microentorno dinámico de un tumor (Debnath J., Brugge J. S. (2005) Nat. Rev. Cancer 5: 675 - 88). Usando inhibidores específicos amplios, se ha implicado la señalización de PI3K en el desarrollo de ácinos de células tumorales de mama humana HMT-3522 T4-2 cultivadas en IrBM, con lo que la inhibición de PI3K era suficiente para restablecer la polaridad apical-basal e inducir la detención del crecimiento (Liu H., Radisky D. C., Wang F., Bissell M. J. (2004) J Cell Biol.; 164: 603 - 12). Dada la contribución propuesta de PI3K a la iniciación y el desarrollo del cáncer de mama, los sistemas de cultivo 3D proporcionan un medio nuevo y completo de evaluar la eficacia de los inhibidores de PI3K de molécula pequeña como el compuesto de la fórmula la.

El receptor de la tirosina cinasa HER2 (Neu/ErbB2) se amplifica y se sobreexpresa en aproximadamente el 20% de los cánceres de mama humanos y desempeña un papel causal en la carcinogénesis mamaria (Yarden Y., Sliwkowski M. X. (2001) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 127 - 37). Esa sobreexpresión de HER2 juega un papel en el cáncer de mama humano se demuestra por la eficacia terapéutica del anticuerpo monoclonal anti-HER2, trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech). Además de la homodimerización, HER2 puede funcionar también como co-receptor para otros miembros de la familia HER. El anticuerpo monoclonal pertuzumab dirige el brazo de dimerización de HER2 (subdominio extracelular II) e interrumpe el reclutamiento de HER2 en complejos ligando-receptor de HER (Franklin et al (2004) Cancer Cell 5: 317 - 28). La eficacia de la inhibición de PI3K se determinó utilizando compuestos de fórmula la y la de combinado con la inhibición de la señalización de la familia HER usando los anticuerpos terapéuticos, trastuzumab y pertuzumab.

Un método para la determinación de compuestos para ser usados en combinación para el tratamiento del cáncer comprende: a) administrar una combinación terapéutica de la reivindicación 1ª a células de cáncer de mama amplificadas HER2 en medio de membrana basal reconstituida rico en laminina, en donde el agente quimioterapéutico se dirige, se une, o modula un receptor de HER2, y b) medir la inhibición de la proliferación de células en donde las células mamarias no malignas y malignas son discriminadas por una o más diferencias fenotípicas seleccionadas entre la viabilidad celular y la morfogénesis acinar.

Las combinaciones de compuestos de fórmula Ia y Ib y anticuerpos terapéuticos fueron evaluadas en células BT474M1 amplificadas HER2 (Ejemplo 16). Las células se cultivaron en membrana basal reconstituida rica en laminina, tridimensional (3D) para el papel de las moléculas de la matriz extracelular en la señalización y la biología del oncogén. La capacidad del cultivo 3D para recapitular el microentorno oncogénico connota que puede ser un predictor más fiable de la eficacia in vivo (en comparación con cultivos bidimensionales (2D) de células en plástico) y puede ser útil para la caracterización de inhibidores y genes diana. El cultivo 3D se utilizó para evaluar la señalización de la familia HER y medir la eficacia sinérgica de los inhibidores. La viabilidad celular y los fenotipos acinares (morfogénesis) se utilizaron como marcadores de la eficacia del fármaco (Ejemplo 16).

Se utilizaron células BT474M1 HER2-amplificadas para detectar la señalización de la familia HER utilizando nuevos fenotipos de cultivo celular 3D, y medir la eficacia sinérgica basada en la morfogénesis acinar (Ejemplo 16). Una realización del medio de membrana basal reconstituida rico en laminina es el extracto de matriz extracelular de Engelbreth-Holm-Swarm, disponible comercialmente como BD Matrigel™ (BD Biosciences). Otra realización ejemplar de una matriz extracelular (ECM) para el cultivo 3D es las células epiteliales de riñón canino Madin-Darby. Una diferencia fenotípica ejemplar es la arquitectura acinar de las células invasivas (malignas) y no invasivas (no malignas).

La morfogénesis acinar se puede puntuar como un ensayo adicional para la eficacia del fármaco. Cada inhibidor se valora para examinar marcadores farmacodinámicos (PD) de ruta, viabilidad celular y fenotipo acinar. Se estableció que la concentración de fármaco inhibidor más baja inhibe efectivamente la diana. La concentración adecuada de un compuesto de fórmula Ia y Ib para ensayos de cultivo 3D se determinó administrando dosis crecientes con consideración a la viabilidad celular global, la farmacodinámica de los correspondientes marcadores de ruta aguas abajo (como AKT1 fosforilados), y cambios en el fenotipo acinar. La concentración de fármaco más baja que inhibe eficazmente la diana fue elegida para los ensayos. Una concentración de compuesto 250 nM de fórmula Ia y IIa se seleccionó como la concentración de trabajo final para ensayos de cultivo 3D.

Los inhibidores directos de HER2 tales como trastuzumab y pertuzumab han demostrado que interfieren con la activación aguas abajo de varias rutas efectoras clave, incluyendo el eje PI3K-AKT. La inhibición combinada de la señalización de la familia PI3K y HER en las células de cáncer de mama HER2-amplificadas puede dar como resultado la inhibición potente de las células tumorales.

Mediante detección de inmunotransferencia de AKT1 fosforilada (pAkt), se confirmó que el compuesto 250 nM de fórmula Ia inhibe poderosamente la señalización aguas abajo de PI3K (Ejemplo 16). Se usaron anticuerpos terapéuticos a concentraciones de saturación de 20 µg/ml y 25 µg/ml para pertuzumab y trastuzumab, respectivamente. La combinación de fórmula Ia y trastuzumab tuvo por resultado una supresión aditiva del crecimiento 3D de ácinos BT474M1 cultivados en Matrigel carente de ligando HRG. Para detectar la señalización heterodímera HER2-HER3 dependiente del ligando, como se ha sugerido que es la transformación en múltiples líneas de células, se añadió HRG 1 nM en estos ensayos. La fórmula Ia y el trastuzumab no tuvieron efecto sobre la proliferación inducida por HRG. Como comparación, el co-tratamiento con fórmula Ia y pertuzumab tuvo por resultado una reducción aditiva del crecimiento y la morfogénesis de ácinos inducida por HRG. Se demostró que este efecto era estadísticamente significativo en múltiples replicados. En ausencia de ligando la reducción del crecimiento 3D de los ácinos fue mayor después del tratamiento con fórmula Ia y trastuzumab en comparación con la fórmula Ia y pertuzumab. La combinación de trastuzumab y compuesto de fórmula Ia inhibe la proliferación de las células y atenúa la morfogénesis inducida por heregulina. La combinación de trastuzumab y compuesto de fórmula Ia tiene efectos potentes y aditivos sobre el crecimiento 3D en suero normal, pero no se observó aditividad con la combinación sobre el crecimiento o morfogénesis de los ácinos en medios tratados con heregulina. La combinación de combinación de pertuzumab y compuestos fórmula Ia inhibe de forma potente, pero aditiva, el crecimiento y morfogénesis de los ácinos BT474M1. La triple combinación de trastuzumab, pertuzumab, y compuesto de fórmula Ia inhibe sinérgicamente el crecimiento y morfogénesis de brote de ácinos BT474M1 (Fig. 20), tanto en los medios suplementados con HRG como estándar.

Cada inhibidor se tituló para examinar marcadores farmacodinámicos (PD) de ruta relevante, la viabilidad celular, y el fenotipo acinar. La concentración de fármaco inhibidor más baja que inhibe efectivamente la diana fue establecida y utilizada en todos los ensayos 3D.

La figura 17 muestra la cuantificación del crecimiento de BT474 en cultivo tridimensional (3D). La viabilidad celular se determinó midiendo los niveles de ATP celular. Células BT474M1 se cultivaron en suero al 10% o bien suero al 10% con heregulina 1 nM y se sometió a las combinaciones de inhibidores que se indica (de izquierda a derecha): medio, DMSO, combinación de 20 µg/ml de trastuzumab y 25 µg/ml de pertuzumab, compuesto de fórmula Ia 250 nM, y la combinación de 20 µg/ml de trastuzumab, 25 µg/ml de pertuzumab, y compuesto de fórmula Ia 250 nM. El crecimiento y la morfogénesis de ácinos se correlaciona con la producción de ATP celular en unidades luminosas relativas (RLU) en medio con 10% de FBS, con y sin heregulina 1 nM.

En medios estándar (sin heregulina), actividad de las células es comparativamente menor en presencia de trastuzumab, pertuzumab o compuesto de fórmula Ia individualmente, pero no en los medios tratados con HRG. La combinación de trastuzumab y compuesto de fórmula Ia inhibió la proliferación de células y atenuó la morfogénesis

inducida por heregulina en el suero normal, pero no se observó aditividad en el crecimiento y la morfogénesis de ácinos en los medios de tratados con heregulina. La combinación de pertuzumab y compuesto de fórmula la inhibió de forma potente y de forma aditiva el crecimiento y la morfogénesis de los ácinos BT474M1 tanto en medio estándar y como en medio suplementado con heregulina. La triple combinación de trastuzumab, pertuzumab y compuesto de fórmula la inhibió sinérgicamente la proliferación y la morfogénesis inducida por heregulina de las células BT474M1 (figura 20) tanto en medio estándar como suplementado con HRG. La combinación de los tres agentes reduce sinérgicamente la viabilidad celular tanto en medio estándar como suplementado con HRG. La morfogénesis inducida por heregulina de células BT474M1 fue también suprimida por la combinación triple, como se determina mediante inspección microscópica. Estos datos sugieren que la triple combinación de fórmula la, trastuzumab y pertuzumab puede proporcionar una eficacia mejorada para el tratamiento de cáncer de mama amplificado por HER2 en pacientes humanos.

El trastuzumab o la fórmula la reducen significativamente el tamaño acinar en medios normales, pero tienen un efecto limitado sobre la morfogénesis inducida por HRG. Como tratamiento combinado, el trastuzumab y la fórmula la pueden minimizar el tamaño acinar y la morfogénesis. Mediante el análisis Cell Titer-Glo de la viabilidad de las células, la aditividad entre trastuzumab y la fórmula la tiene como resultado la disminución del crecimiento celular en medios normales, pero no se observa diferencia alguna con la adición de HRG.

El pertuzumab inhibe completamente la morfogénesis inducida por HRG, mientras que la fórmula la reduce solo en parte el fenotipo. Juntos, pertuzumab y fórmula la disminuyen el crecimiento celular y la morfogénesis tanto en medios normales como en los suplementados con HRG. Por evaluación de la viabilidad celular como se mide por Cell Titer-Glo, se observa una disminución en la actividad celular en presencia de pertuzumab y fórmula la, ya sea como agentes individuales o terapia combinada en medio normal. Los ácinos tratados con HRG también muestran una tendencia similar, pero en menor medida. Por la evaluación de la comparación del test T de Dunnett de replicados de Cell Titer Glo ($n = 8$), la combinación de pertuzumab y fórmula la inhibe significativamente la actividad celular ($p = 0,0054$).

La figura 18 muestra un efecto similar con la adición de fórmula lb al tratamiento dual con trastuzumab y pertuzumab. El crecimiento de BT474 en cultivo celular 3D se midió tras el tratamiento de 20 $\mu\text{g/ml}$ de trastuzumab, 25 $\mu\text{g/ml}$ de pertuzumab o compuesto de fórmula lb 20 nM, como se indica. La monoterapia con fórmula lb reduce el tamaño acinar en medios normales y suplementados con HRG. La reducción más significativa en el tamaño acinar y la morfogénesis, como se determina midiendo la viabilidad celular utilizando Cell Titer Glo, fue el resultado del tratamiento combinado de fórmula lb, trastuzumab y pertuzumab.

Eficacia del xenoinjerto tumoral in vivo

La eficacia de las combinaciones de la invención se puede medir *in vivo* implantando aloinjertos o xenoinjertos de células cancerosas en roedores y tratando con las combinaciones a los animales portadores de tumor. Son de esperar resultados variables dependiendo de la línea de células, la presencia o ausencia de ciertas mutaciones en las células tumorales, la secuencia de administración del compuesto de fórmula I o II y el agente quimioterapéutico, el régimen de dosificación, y otros factores. Los ratones sujeto fueron tratados con fármaco (s) o testigo (vehículo) y vigilados durante varias semanas o más para medir el tiempo hasta la duplicación del tumor, la destrucción celular logarítmica ("log cell kill"), y la inhibición tumoral (Ejemplo 17).

La figura 19 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones atímicos CD-1 (Charles River Labs) con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-361.1 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% metilcelulosa/0,2% de Tween 80), 150 mg/kg de fórmula la, 5 mg/kg de docetaxel, y la combinación de fórmula la 150 mg/kg y docetaxel 5 mg/kg. Los ratones se dosificaron con docetaxel en los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) por vía intravenosa mientras que la fórmula la se dosificó al día durante 21 días por cebado oral. Cuando se administra en el mismo día, la fórmula la se dosificó 1 hora después de docetaxel. La combinación de 150 mg/kg de fórmula la con 5 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama MDA-MB-361.1 *in vivo* más que cada agente individual por sí solo.

El grupo de 11 animales a los que se administra fórmula la 150 mg/kg mostró un 75% de inhibición después de 21 días, y 3 regresiones parciales y el 66% de inhibición después de 41 días. El grupo de 10 animales tratados con docetaxel 5 mg/kg mostró 78% de inhibición después de 21 días y 2 regresiones parciales, y 26% de inhibición después de 41 días. El grupo de 9 animales tratados con la combinación de fórmula la 150 mg/kg y docetaxel 5 mg/kg mostró un 90% de inhibición después de 21 días y 7 regresiones parciales, y el 83% de inhibición después de 41 días. La combinación mostró mejor eficacia en la inhibición de tumores y fue estadísticamente significativa en comparación con cada fármaco individual ($p = 0,0001$ frente a docetaxel y $p = 0,02$ frente a fórmula la).

La figura 20 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo en ratones nu/nu hembra (atímicos) NMRI con xenoinjertos de explante de tumor de mama primario MAXF 401 (triple negativo) dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% metilcelulosa/0,2% de Tween 80), 100 mg/kg de fórmula la, 15 mg/kg de docetaxel y la combinación de 100 mg/kg de fórmula la y 15 mg/kg. MAXF 401 son tumores de mama primarios obtenidos de biopsia directamente de un paciente que respondió a docetaxel e implantados por vía subcutánea en ratones. Este

grupo de cáncer de mama es una subpoblación de pacientes "triple negativo", que son negativos a HER2, negativos a ER (receptor de estrógeno) y negativos a PR (receptor de progesterona). La sensibilidad al docetaxel se retiene en los ratones ex vivo. Los ratones fueron dosificados por vía intravenosa con docetaxel en el día 0 y en el día 11, mientras que la fórmula la se administró en el día 0 - 4, 11 - 17 y 21 - 28 por sonda oral. Los animales fueron vigilados durante 22 días más en relación con el crecimiento del tumor después de la última dosis de fórmula la (el número total de días que los animales estuvieron en estudio fue de 50). Cuando se administra en el mismo día, la fórmula la se dosificó 1 hora después del docetaxel. El grupo de 10 animales dosificados con 100 mg/kg de fórmula la mostró una inhibición del 49% en el día 28. El grupo de 10 animales dosificados con 15 mg/kg de docetaxel mostró una inhibición del 95% en el día 28. El grupo de 10 animales tratados con la combinación de fórmula la 150 mg/kg y docetaxel 15 mg/kg mostró una inhibición superior al 90% al cabo de 28 días. Al final del estudio (día 50), los animales dosificados con docetaxel y fórmula la solo tenían rebrote de sus tumores y la inhibición del tumor disminuyó de 95% a 68% y de 49% a 10%, respectivamente. Sin embargo, al final del estudio (día 50), la combinación de docetaxel y fórmula la tuvo por resultado que en los diez animales habían tenido regresión sostenida del tumor (> 90% de inhibición) de tumores de mama primarios MAXF 401 y era estadísticamente significativa en comparación con cada fármaco individual ($p = 0,05$ frente a docetaxel y $p < 0,001$ frente a fórmula la). Dado que los tumores de mama MAXF 401 son derivados de un paciente que respondió a la terapia con taxano, la eficacia mejorada observada ex vivo sugiere que la combinación de fórmula la puede tener beneficios clínicos en el cáncer de mama cuando se combina con docetaxel.

La figura 21 muestra el cambio de volumen medio del tumor a lo largo del tiempo en ratones atímicos hembra nu/nu NMRI con xenoinjertos de explantes de tumor de mama primario MaxF 401 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% metilcelulosa / 0,2% de Tween 80), 100 mg/kg fórmula la, 15 mg/kg de docetaxel y la combinación de 100 mg/kg fórmula la y 15 mg/kg de docetaxel. MaxF 401 son tumores de mama primarios obtenidos por biopsia directamente de un paciente que respondió a docetaxel y se implantan por vía subcutánea en ratones. La resistencia al docetaxel se retiene ex vivo en estos ratones. Los ratones fueron dosificados por vía intravenosa con docetaxel en el día 0, 11, 22 y 44, y la fórmula la se dosificó en el día 0 - 5, 11 - 16 y 22 - 27, 30 - 32, 42 y 44 por sonda oral. Los animales fueron controlados por otros 6 días más en cuanto al crecimiento del tumor después de la última dosis de fórmula la (el número total de días que los animales estaban en estudio fue de 50). Cuando se administra en el mismo día, la fórmula la se dosificó 1 hora después del docetaxel. El grupo de 10 animales dosificados con 100 mg/kg de fórmula la mostró un 54% de inhibición después de 49 días. El grupo de 10 animales dosificados con 15 mg/kg de docetaxel mostró un 36% de inhibición después de 49 días. El grupo de 10 animales dosificados con la combinación de fórmula la 100 mg/kg y docetaxel 15 mg/kg mostró un 87% de inhibición al cabo de 49 días. Al final del estudio (día 50), la combinación dio lugar a la regresión sostenida del tumor (> 87% de inhibición) y fue estadísticamente significativa en comparación con cada fármaco individual ($p = 0,0005$ frente a docetaxel y $p = 0,0007$ frente a fórmula la). Dado que los tumores de mama MAXF 1162 son derivados de un paciente en el que fracasó la terapia con taxano, la eficacia mejorada observada ex vivo sugiere que la combinación de fórmula la con docetaxel puede tener beneficios clínicos en cáncer de mama resistentes al taxano en las personas.

La figura 22 muestra el cambio de volumen medio del tumor a lo largo del tiempo en ratones nu/nu (atímicos) hembra CRL con xenoinjertos tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) NCI-H2122 dosificados en el día 0 con: vehículo MCT (0,5% de metilcelulosa/0,2% de Tween 80), 50 mg/kg de fórmula la, 75 mg/kg erlotinib y la combinación de 50 mg/kg de fórmula la y 75 mg/kg erlotinib. Los ratones se les administró al día con erlotinib y fórmula la día durante 16 días por sonda oral. Los animales fueron controlados por el crecimiento del tumor durante 5 días (a final del estudio fue el día 21). Tanto erlotinib como la fórmula la se administraron simultáneamente. El grupo de 8 animales dosificados con 50 mg/kg de fórmula la mostró 17% de inhibición del tumor después de 20 días. El grupo de 8 animales dosificados con / kg mostró una inhibición erlotinib 75 mg 21% después de 20 días. El grupo de 8 animales dosificados con la combinación de fórmula la 50 mg/kg y erlotinib 75 mg/kg mostró 55% de inhibición después de 20 días. Al final del estudio (día 21), la combinación de 50 mg/kg de fórmula la y erlotinib era aditivo y dieron como resultado significativo retraso en el crecimiento tumoral de xenoinjertos de tumores NCI-H2122 NSCLC en comparación con cada fármaco solo ($p = 0,032$ vs erlotinib y $p = 0,019$ vs fórmula la).

La figura 23 muestra el cambio de volumen medio del tumor a lo largo del tiempo en ratones nu/nu hembra HRLN con xenoinjertos de células tumorales de mama (mutante PI3K) MCF-7 dosificados el día 1 con: vehículo MCT y PBS (MCT; 0,5% de metilcelulosa/0,2% de Tween 80 y PBS: solución salina tamponada con fosfato), IgG control 5 mg/kg, mB20-4.1 murino anti-VEGF (anti-angiogénico) 5 mg/kg, fórmula la 150 mg/kg, y la combinación de fórmula la 150 mg/kg y MB20-4.1 murino anti-VEGF 5 mg/kg. Los animales se dosificaron con IgG de control y mB20-4.1 intraperitonealmente dos veces a la semana durante 3 semanas y con fórmula la al día durante 21 días por alimentación forzada por vía oral y el crecimiento tumoral se vigiló durante otros 41 días (el número total de días en estudio fue 62). La fórmula la y mB20-4.1 fueron coadministrados al mismo tiempo. El grupo de 13 de los 15 animales dosificados y en estudio con IgG control mostró un 19% de inhibición y 0 regresiones parciales después de 21 días. El grupo de 10 de los 15 animales tratados y en estudio con anti-VEGF murino mB20-4.1 mostró 49% de inhibición y 0 regresiones parciales después de 21 días. El grupo de 13 animales dosificados y en estudio con 150 mg/kg de compuesto de fórmula la mostró un 36% de inhibición y 0 regresiones parciales después de 21 días. El grupo de 10 animales dosificados y en estudio con la combinación de compuesto de fórmula la y anti-VEGF murino mB20-4.1 mostró un 66% de inhibición y 4 regresiones completas después de 21 días. Los animales dosificados con la combinación de fórmula la y anti-VEGF murino mB20-4.1 mostraron una inhibición significativa y sostenida de

regresión del crecimiento del tumor 41 días después de haber terminado la dosificación (final del estudio) en comparación con cada fármaco individual ($p < 0,006$ frente a fórmula la y $p < 0,01$ frente a mB20-4.1).

La figura 24 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de glioma U87MG dosificados el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 109 mg/kg, temozolomida 100 mg/kg, y la combinación de fórmula la 109 mg/kg y temozolomida 100 mg/kg, junto con los ratones que no recibieron fármaco (grupo sin tratamiento). Los animales fueron dosificados con fórmula la por vía oral al día durante 21 días, y temozolomida por vía oral al día durante 5 días. La combinación de 109 mg/kg de fórmula la con 100 mg/kg de temozolomida sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de glioma U87MG in vivo más que la fórmula la o la temozolomida sola, y tuvo por resultado la regresión del tumor seguida del retraso del crecimiento del tumor.

La figura 25 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones CR / Hollister atímicos CD-1 con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-361.1 dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 150 mg/kg, gemcitabina 100 mg/kg, y la combinación de fórmula la 150 mg/kg y gemcitabina 100 mg/kg, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). Los animales fueron dosificados con la fórmula la por vía oral al día durante 21 días, y gemcitabina por vía intraperitoneal en los días 1, 4, 7 y 10 (q3d X 4). La combinación de 150 mg/kg de fórmula la con 100 mg/kg de gemcitabina sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama MDA-MB-361.1 in vivo más que la fórmula la o la gemcitabina sola y tuvo por resultado la regresión del tumor seguida del retraso del crecimiento del tumor.

La figura 26 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama BT474 dosificados en el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) a 18, 36, y 73 mg/kg, trastuzumab 20 mg/kg, y las combinaciones de fórmula la a 18, 36, y 73 mg/kg y trastuzumab 20 mg/kg, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). Los animales fueron dosificados con fórmula la por vía oral al día durante 21 días, y trastuzumab por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas. La combinación de 73 mg/kg de fórmula la con 20 mg/kg de trastuzumab sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama BT474 in vivo más que la fórmula la o trastuzumab solo y tuvo por resultado la regresión del tumor seguida del retraso del crecimiento del tumor.

El tratamiento de células BT474-M1 (subclón pasajeado in vivo de BT474) con trastuzumab causó una disminución en pAKT igual a la disminución conseguida con el compuesto de fórmula la (GDC-0941). La adición de trastuzumab a fórmula la 50 nM causó un descenso potenciado de pAKT, dependiente de la dosis. A la dosis máxima de trastuzumab, la reducción adicional fue de 29 - 38% del tratamiento con GDC-0941 solo. El efecto combinatorio potenciado en la inhibición pAKT no fue transitorio y todavía pudo ser detectado 48 h después del tratamiento. El efecto combinatorio visto en pAKT se reflejó también en los componentes de señalización de AKT corriente abajo. Las células BT474-M1 fueron tratadas durante cuatro horas con fórmula la en presencia o ausencia de trastuzumab. La adición de trastuzumab disminuyó aún más la fosforilación del sustrato AKT directo PRAS40 (Thr246) y un sustrato distal, la proteína ribosómica fosfo-S6 (Ser235/236), lo que sugiere que trastuzumab y la fórmula la tienen un efecto combinatorio potenciado de la señalización de AKT aguas abajo. La inhibición de la ruta PI3K / Akt potenciada tuvo por resultado la disminución de la proliferación/ viabilidad de células se demostró cuando las células BT474-M1 fueron tratados durante seis días y se midió la viabilidad celular. El trastuzumab solo redujo la proliferación/viabilidad en un 40%. En ausencia de trastuzumab, el valor IC_{50} para la fórmula la fue 296 nM. La adición de trastuzumab causó una reducción potenciada dependiente de la dosis en la proliferación/viabilidad. Una dosis máxima de trastuzumab de 10 μ g/ml tuvo por resultado un descenso del 64% en la concentración de fórmula la que se requiere para alcanzar su IC_{50} de 106 nM, lo que demuestra un efecto combinatorio potenciado en la disminución de la proliferación/viabilidad de las células también. Se observó también un efecto combinatorio similar sobre pAKT y la inhibición de la proliferación se observó también cuando se trataron células SKBR-3, pero no cuando se trataron células KPL-4 que no responden al trastuzumab. La combinación de trastuzumab y fórmula la inhibe la proliferación sinérgicamente en las células BT474 y SKBR-3 sobre la mayor parte de la gama de fármacos efectivos según lo determinado por el software Calcsyn, que muestra que la combinación potencia el efecto inhibitorio sobre AKT y sus dianas aguas abajo, resultando un efecto sinérgico sobre la proliferación de células de cáncer de mama sensibles a trastuzumab.

La combinación de trastuzumab y fórmula la induce aditivamente la apoptosis de las células de cáncer de mama BT474-M1 tratadas durante 48 h. La combinación de trastuzumab y la fórmula la aumentó la acumulación de fragmentos segmentados de caspasa-3, lo que indica la activación de este efector clave caspasa. La combinación de trastuzumab y fórmula la también tuvo por resultado un aumento del fragmento PARP de 89 kDa escindido, una respuesta conocida a la activación de la caspasa-3. También se incrementó la actividad de las caspasas 3 y 7 cuando se añadió trastuzumab al tratamiento con la fórmula la. La combinación de trastuzumab con fórmula la 250 nM aumentó la actividad de las caspasas 3 y 7 a un nivel similar al detectado con una dosis cuatro veces más alta (1.000 nM) de fórmula la sola. Es importante el hecho de que este aumento en la actividad de la caspasa se reflejó en el índice de apoptosis de estas células. La adición de trastuzumab disminuyó drásticamente la concentración de fórmula la requerida para inducir la apoptosis. Se detectó un nivel de apoptosis casi equivalente cuando las células fueron tratadas con 100 nM de fórmula la y trastuzumab, que cuando se trató con 1.000 nM de fórmula la solo. Como era de esperar, el aumento de la apoptosis se reflejó en una disminución de la viabilidad celular al cabo de 48

h. Se observó un incremento similar en la actividad de la caspasa y apoptosis cuando células SKBR-3 fueron tratadas con la combinación de inhibidor. La combinación de fórmula la con trastuzumab reduce significativamente la concentración de fórmula la requerida para alcanzar el umbral de activación de la caspasa y la apoptosis en células de cáncer de mama sensibles al trastuzumab. Por consiguiente, el tratamiento con trastuzumab podría ser utilizado para sensibilizar células amplificadas HER2 a la inhibición de PI3K y por tanto proporcionar un nivel adicional de especificidad de tumor para el inhibidor de PI3K fórmula la.

La figura 27 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama BT474 dosificados en el día 0 con: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, trastuzumab 15 mg/kg por vía intraperitoneal una vez a la semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intraperitoneal una vez a la semana durante 3 semanas; fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intraperitoneal una vez a la semana durante 3 semanas; y fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y trastuzumab 15 mg/kg por vía intraperitoneal una vez a la semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb dosificada al día con 15 mg/kg de trastuzumab dosificado una vez por semana sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama BT474 in vivo más que la fórmula la o el trastuzumab solo, y tuvo por resultado el retraso del crecimiento del tumor.

La figura 28 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama MCF-7 dosificados en el día 0 con: anticuerpo anti-VEGF murino B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, o fórmula lb a 5 mg/kg y las combinaciones de: fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante los días 0 - 3, 10 - 26 y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo). La combinación de 5,0 mg/kg de fórmula lb con 5 mg/kg de B20-4.1 sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama MCF-7 in vivo más que la fórmula lb o B20-4.1 solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor.

La figura 29 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama Fo5 dosificados en el día 0 con: anticuerpo anti-VEGF murino B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 36 y 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 2,5 y 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de: fórmula la a 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula la a 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, y fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 36 mg/kg de fórmula la con 5 mg/kg de B20-4.1 sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama Fo5 in vivo más que la fórmula la o B20-4.1 sólo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 73 mg/kg de fórmula la con 5 mg/kg de B20-4.1 también sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama Fo5 in vivo más que la fórmula la o B20-4.1 solo, y dio lugar a retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb con 5 mg/kg de B20-4.1 sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama Fo5 in vivo más que la fórmula lb o B20-4.1 solo, y dio lugar a retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 5,0 mg/kg de fórmula lb con 5,0 mg/kg de B20-4.1 sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de mama Fo5 in vivo más que la fórmula lb o B20-4.1 solo, y tuvo por resultado la regresión del crecimiento tumoral.

La figura 30 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de mama MDA-MB-231 dosificados en el día 0 con: anticuerpo anti-VEGF murino B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 36 y 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 8 días, y las combinaciones de: fórmula la a 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula la a 73 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 3 semanas; y fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 8 días y B20-4.1 5 mg/kg por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 1,5 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 5,0 mg/kg de fórmula lb con 5,0 mg/kg de B20-4.1 sinergizó para inhibir el crecimiento del tumor de mama MDA-MB-231 in vivo más que la fórmula lb o B20-4.1 solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor.

La figura 31 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) H1299 dosificados el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 100 mg/kg por vía oral al día durante 6 días, fórmula la en 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, la fórmula la 25 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de la fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 6 días y erlotinib 50

mg/kg por vía oral al día durante 6 días; fórmula la 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días; y fórmula la 25 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 25 mg/kg de fórmula la con 50 mg/kg de erlotinib synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico H1299 in vivo más que la fórmula la o el erlotinib solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 50 mg/kg de fórmula la con 50 mg/kg de erlotinib también synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico NCI-H1299 in vivo más que la fórmula la o el erlotinib solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor.

La figura 32 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico H520 (NSCLC) de células tumorales dosificados el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 73 mg/kg por vía oral al día durante 4 días, fórmula la a 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la 18 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y las combinaciones de fórmula la 73 mg/kg por vía oral al día durante 4 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 4 días; fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días; y fórmula la 18 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 18 mg/kg de fórmula la con 50 mg/kg de erlotinib synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico H520 in vivo más que la fórmula la o erlotinib solo, y dio lugar a retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 36 mg/kg de fórmula la con 50 mg/kg de erlotinib también synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico H520 in vivo más que la fórmula la o erlotinib solo y dio lugar a retraso del crecimiento del tumor.

La figura 33 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) H1299 dosificados el día 0 con: erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 21 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral dos veces por semana durante 3 semanas y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días; y fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb dosificada por vía oral al día con 50 mg/kg de erlotinib dosificado por vía oral al día durante 21 días synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico H520 in vivo más que la fórmula lb o erlotinib solo, y dio lugar a retraso del crecimiento del tumor.

La figura 34 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos hembra NCR Taconic con xenoinjertos de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) NCI-H2122 de células tumorales dosificados el día 0 con: erlotinib 75 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, y las combinaciones de: fórmula lb a 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 16 días; fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 16 días; y fórmula lb a 7,5 mg/kg por vía oral al día durante 16 días y erlotinib 50 mg/kg por vía oral al día durante 16 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb con 75 mg/kg de erlotinib synergizó inhibiendo el crecimiento tumoral del cáncer de pulmón no microcítico NCI-H2122 in vivo más que la fórmula lb o el erlotinib solo, y tuvo por resultado la estasis del tumor.

La figura 35 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células cancerosas de melanoma humano A375 dosificados el día 0 con: PD-0325901 3 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula la (GDC-0941) a 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, y la combinación de: PD-0325901 3 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y fórmula la 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 73 mg/kg de fórmula la con 3 mg/kg de PD-0325901 synergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de melanoma humano A375 in vivo más que la fórmula la o PD-0325901 solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor y el retraso del crecimiento tumoral.

La figura 36 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de melanoma humano A375 dosificados el día 0 con: temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días, fórmula lb a 10 mg/kg por vía oral una vez a la semana durante 3 semanas, fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb a 10 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días; y fórmula lb a 5 mg/kg por vía oral una vez por semana durante 3 semanas y temozolomida 100 mg/kg por vía oral al día durante 5 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 5 mg/kg de fórmula lb con 100 mg/kg de temozolomida synergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de melanoma humano A375 in vivo más que la fórmula lb o temozolomida sola, y tuvo como resultado el retraso del crecimiento tumoral.

La figura 37 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos celulares de cáncer de ovario humano SKOV3 dosificadas el día 0 con: fórmula la (GDC-0941) 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula la 73 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas; fórmula la 36 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas; y fórmula la 73 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa a la semana durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 36 mg/kg dosificados diariamente de fórmula la con 10 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de ovario humano SKOV3 in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor. La combinación de 73 mg/kg de fórmula la dosificada al día con 10 mg/kg de docetaxel también sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de ovario humano SKOV3 in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor.

La figura 38 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de ovario humano SKOV3 dosificados en el día 0 con: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, fórmula lb 1 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas, docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas; y fórmula lb 1 mg/kg por vía oral al día durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg semanal por vía intravenosa durante 3 semanas; junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 5 mg/kg de fórmula lb con 10 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de ovario humano SKOV3 in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y tuvo por resultado la estasis del tumor.

La figura 39 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de ovario humano SKOV3 dosificados el día 0 con: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas, fórmula lb 10 mg/kg por vía oral semanal durante 3 semanas, docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas, y las combinaciones de: fórmula lb 5 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas; y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral por semana durante 3 semanas y docetaxel 10 mg/kg por vía intravenosa semanal durante 3 semanas, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 10 mg/kg de fórmula lb dosificada por vía oral semanal con 10 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor de ovario humano SKOV3 in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y dio lugar al retraso del crecimiento del tumor.

La figura 40 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos beige SCID hembra con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata primario humano Lucap 35V dosificados en el día 0 con: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3), fórmula la (GDC-0941) 50 mg/kg por vía oral al día durante 18 días fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 18 días y las combinaciones de: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) y fórmula la 50 mg/kg por vía oral al día durante 18 días y docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) y fórmula la 100 mg/kg por vía oral al día durante 18 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo). La combinación de 100 mg/kg de fórmula la con 5 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humana Lucap 35 V in vivo más que la fórmula la o docetaxel solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor.

La figura 41 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos beige SCID hembra con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata primario humano Lucap 35V dosificados el día 0 con: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días, fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días y las combinaciones de: docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) y fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días y docetaxel 5 mg/kg por vía intravenosa los días 1, 5 y 9 (q4d x 3) y fórmula lb 5 mg/kg por vía oral al día durante 15 días junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb con 5 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano Lucap 35 V in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor. La combinación de 5,0 mg/kg de fórmula lb con 5 mg/kg de docetaxel también sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano Lucap 35 V in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor.

La figura 42 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra CRL con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de próstata humano primario NCI-PC3 dosificados en los días 1, 5, 9, y 13 (q4d x 4) con 2,5 mg/kg docetaxel por vía intravenosa, fórmula lb 2,5 mg/kg de fórmula lb los días 1, 5, 9 y 13 (q4d x 4), fórmula lb 10 mg/kg por vía oral los días 1, 5, 9 y 13 (q4d x 4), y la combinación de: docetaxel 2,5 mg/kg por vía intravenosa y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo del vehículo). La combinación de 10 mg/kg de fórmula lb dosificada en los días 1, 5, 9 y 13 con 5 mg/kg de docetaxel sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano PC3-NCI in vivo más que la fórmula lb o docetaxel solo, y dio lugar a la regresión del tumor.

La figura 43 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones nu/nu hembra CRL con xenoinjertos celulares de cáncer de próstata primario humano PC3-NCI dosificados el día 0 con: gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días (q3d) por 4 veces, fórmula la (GDC-0941) 150 mg/kg por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces fórmula lb 2,5 mg / kg por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces, fórmula lb 5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces y las combinaciones de: gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula la 150 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces; gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 2,5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces, gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 5 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces, gemcitabina 100 mg/kg por vía intraperitoneal cada 3 días por 4 veces y fórmula lb 10 mg/kg por vía oral cada 3 días por 4 veces, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo). La combinación de 150 mg/kg de fórmula la dosificada por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces con 100 mg/kg de gemcitabina sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano PC3-NCI in vivo más que la fórmula la o gemcitabina solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor y el retraso del crecimiento tumoral. La combinación de 2,5 mg/kg de fórmula lb dosificada por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces con 100 mg/kg de gemcitabina sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano PC3-NCI in vivo más que la fórmula la o gemcitabina solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor y el retraso del crecimiento tumoral. La combinación de 5,0 mg/kg de fórmula lb dosificada por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces con 100 mg/kg de gemcitabina sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano PC3-NCI in vivo más que la fórmula la o gemcitabina solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor y el retraso del crecimiento tumoral. La combinación de 10 mg/kg de fórmula lb dosificada por vía oral cada 3 días (q3d) por 4 veces con 100 mg/kg de gemcitabina sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor primario de próstata humano PC3-NCI in vivo más que la fórmula la o gemcitabina solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor y el retraso del crecimiento tumoral.

La figura 44 muestra el cambio del volumen tumoral medio a lo largo del tiempo con ratones atímicos hembra Harlan con xenoinjertos de células tumorales de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) NCI-H2122 (K-ras) dosificados el día 0 con: PD-0325901 6,3 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, fórmula la (GDC-0941) a 100 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, y la combinación de: PD-0325901 6,3 mg/kg por vía oral al día durante 21 días y fórmula la a 100 mg/kg por vía oral al día durante 21 días, junto con ratones que no recibieron fármaco (grupo de vehículo). La combinación de 100 mg/kg de fórmula la con 6,3 mg/kg de PD-0325901 sinergizó inhibiendo el crecimiento del tumor NSCLC NCI-H2122 (K-ras) in vivo más que la fórmula la o PD-0325901 solo, y tuvo por resultado la regresión del tumor.

Eficacia tumoral del modelo de ratón construido genéticamente.

La terapia de combinación con compuestos de fórmula la y lb y agentes quimioterapéuticos fue eficaz en el tratamiento de cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) o microcítico, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), y el adenocarcinoma de páncreas (PDAC) en modelos de ratón construidos genéticamente (GEMM) que recapitulan la progresión del tumor humano en un microentorno de tejido endógeno (Singh, M. y Johnson, L. (2006) Clin. Cancer Res. 12 (18): 5312 - 5328, documento US 2007/0292948, de los cuales ambos se incorporan por referencia en su totalidad). Los resultados sorprendentes e inesperados de estos experimentos pueden predecir la respuesta clínica de ciertas poblaciones de pacientes que tienen tipos de tumores y mutaciones seleccionados para tal terapia de combinación.

En un modelo para SCLC (Meuwissen et al (2003) Cancer Cell 4 (3): 181 - 189) que lleva las mutaciones encontradas comúnmente en la población de pacientes, el compuesto de fórmula la solo no mostró efectos sobre el crecimiento del tumor como estableció la formación de imágenes microCT, pero sí que tuvieron un efecto (relación de riesgo significativa) en la supervivencia en comparación con los controles o testigos. Animales dosificados con la combinación de compuesto de fórmula la y anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 mostraron una inhibición significativa y regresión del crecimiento del tumor por imágenes microCT, en comparación con los controles y cada fármaco individual. La combinación de compuesto de fórmula la y anti-VEGF-A murino mB20-4.1 tuvo también un impacto estadísticamente significativo en la supervivencia global en comparación con los controles. Los animales dosificados con la triple combinación de compuesto de fórmula la, carboplatino, y anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 también mostraron una respuesta anti-tumoral medible y duradera en comparación con los agentes individuales. La combinación triple aumentó significativamente la supervivencia en comparación con los agentes individuales, y el compuesto de fórmula la en este triple régimen mejoró la ventaja de supervivencia en comparación con la combinación dual carboplatino y mB20-4.1 murino anti-VEGF-A. Además, estos regímenes combinatorios disminuyeron notablemente la incidencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales y el hígado en comparación con los controles y cada fármaco individual.

Un GEMM para el cáncer de páncreas (Aguirre et al (2003) Genes & Development. 17: 3112 - 3126) abarca las mutaciones encontradas en la mayoría de los pacientes con esta enfermedad. Estos ratones, cuando se trataron con compuesto de fórmula la, mostraron una disminución inicial en el crecimiento tumoral a través de ultrasonido en comparación con los ratones tratados con testigo. Sin embargo, esta respuesta no fue duradera y el tratamiento de un agente individual tuvo un efecto moderado (no estadísticamente significativo) en la supervivencia de estos ratones. En cambio, la fórmula la en combinación con anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 mostró una disminución significativa en el crecimiento del tumor a través de ultrasonido (en comparación con los ratones no tratados y

agentes individuales), así como un impacto significativo sobre la supervivencia. La terapia de combinación con gemcitabina, bien sea con o sin anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1, no mostró mejoras significativas en la inhibición del crecimiento tumoral (por medio de ultrasonido) o la supervivencia en comparación con la gemcitabina sola.

En un GEMM NSCLC impulsado por K-ras (Johnson et al (2001) Nature 410: 1111 - 1116; Jackson et al (2001) Genes & Development 15: 3243 - 3248), el tratamiento con compuesto de fórmula Ia solo afectó mínimamente al crecimiento del tumor, como se midió por formación de imágenes microCT, y no tuvo efecto alguno sobre la supervivencia en comparación con los controles. El tratamiento con compuesto de fórmula Ia en combinación con erlotinib mostró una moderada inhibición del crecimiento del tumor y ventaja de supervivencia en comparación con los tratamientos con un agente individual. El tratamiento con compuesto de fórmula Ia en combinación con anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 tuvo por resultado un notable descenso en el crecimiento del tumor y aumento de la supervivencia en comparación con los controles, aunque no significativamente mayor que los efectos observados con anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 como agente único. Animales dosificados con la triple combinación de compuesto de fórmula Ia, carboplatino y anti-VEGF-A murino mB20-4.1.1 mostraron también una respuesta anti-tumoral medible y duradera en comparación con los controles e impactaron también de forma acusada sobre la supervivencia en este modelo.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas pueden incluir combinaciones de la presente invención como se definieron anteriormente y uno o más vehículos, agentes de deslizamiento, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de fórmula Ia o Ib, y agentes quimioterapéuticos de la presente invención, pueden existir tanto en formas no solvatadas como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y similares, y se pretende que la invención comprenda tanto las formas solvatadas como las no solvatadas.

Los compuestos de fórmula Ia o Ib y agentes quimioterapéuticos de la presente invención también pueden existir en distintas formas tautoméricas, y todas estas formas están comprendidas dentro del alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles mediante una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protón (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones mediante la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto-enol y imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de enlace.

Las composiciones farmacéuticas comprenden tanto la composición global como unidades de dosificación individuales compuestas de más de un agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, dos) que incluyen un compuesto de fórmula Ia o Ib y un agente quimioterapéutico seleccionado entre las listas de los agentes adicionales descritos en el presente texto, junto con cualquier excipiente, diluyente, vehículo, o agente de deslizamiento farmacéuticamente inactivo. La composición global y cada unidad de dosificación individual pueden contener cantidades fijas de los agentes farmacéuticamente activos mencionados anteriormente. La composición global es material que aún no se ha conformado en unidades de dosificación individuales. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares. Del mismo modo, el método de tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición farmacéutica de la presente invención, descrito en el presente texto, también pretende que abarque la administración de la composición global y unidades de dosificación individuales.

Las composiciones farmacéuticas abarcan también compuestos de la presente invención marcados con isótopos que son idénticos a los citados en el presente texto, pero por el hecho de que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número de masa que se encuentra generalmente en la naturaleza. Todos los isótopos de cualquier átomo o elemento en particular tal como se especifica están contemplados dentro del alcance de los compuestos de la invención, y sus usos. Entre los isótopos ejemplares que se pueden incorporar en los compuestos de la invención se incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro y yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I y ^{125}I . Ciertos compuestos de la presente invención marcados isotópicamente (por ejemplo, los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución en el tejido de compuesto y/o sustrato. Los isótopos tritio (^3H) y carbono-14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y su detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, aumento en la vida media in vivo o requisitos de dosificación reducidos) y por ello pueden preferirse en algunas circunstancias. Los isótopos emisores de positrones tales como ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F son útiles para la tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los compuestos de la presente invención marcados isotópicamente se pueden preparar generalmente siguiendo procedimientos análogos a los descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos en el presente texto más adelante, sustituyendo un reactivo marcado isotópicamente por un reactivo no marcado isotópicamente.

Los compuestos de fórmula Ia o Ib y agentes quimioterapéuticos se formulan de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar para su uso en una combinación terapéutica para el tratamiento terapéutico (incluyendo el tratamiento profiláctico) de trastornos hiperproliferativos en mamíferos incluyendo seres humanos.

Los vehículos, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles en agua y/o hinchables, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El vehículo, diluyente o excipiente usado en particular dependerá de los medios y el fin para el que se está aplicando el compuesto de la presente invención. Los disolventes se seleccionan generalmente basándose en disolventes reconocidos como seguros (GRAS) por las personas expertas en la técnica para ser administrados a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Los disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilen glicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), etc., y mezclas de los mismos. Las formulaciones pueden incluir también uno o más tampones, agentes estabilizantes, agentes tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes de opacidad, agentes deslizantes, coadyuvantes de procesamiento, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes y otros conocidos aditivos para proporcionar una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo) o para ayudar en la elaboración del producto farmacéutico (es decir, del medicamento).

Las formulaciones se pueden preparar usando procedimientos convencionales de disolución y mezclado. Por ejemplo, la sustancia fármaco a granel (es decir, el compuesto de la presente invención o la forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de complejación conocido) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. El compuesto de la presente invención se formula típicamente en formas farmacéuticas de dosificación para proporcionar una dosificación del fármaco fácilmente controlable y para posibilitar el cumplimiento del paciente con el régimen prescrito.

La composición (o formulación) farmacéutica para aplicación puede ser envasada en una diversidad de formas, dependiendo del método utilizado para la administración del fármaco. Generalmente, un artículo para distribución incluye un recipiente en el que está depositada la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los recipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como botellas (de plástico y de vidrio), bolsitas, ampollas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulación para prevenir un acceso indiscreto al contenido del paquete. Además, el recipiente tiene depositada sobre el mismo una etiqueta que describe el contenido del mismo. La etiqueta también puede incluir las advertencias apropiadas.

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse para varias vías y tipos de administración. Por ejemplo, un compuesto de fórmula Ia o Ib que tiene el grado de pureza deseado se puede mezclar opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18ª edición, Mack Publ. Co., Easton, PA), en forma de una formulación liofilizada, polvo molido, o una solución acuosa. La formulación puede llevarse a cabo mezclando a temperatura ambiente, al pH apropiado, y en el grado de pureza deseado, con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero puede oscilar de aproximadamente 3 a aproximadamente 8.

La formulación farmacéutica es preferiblemente estéril. En particular, las formulaciones a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Dicha esterilización se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas para filtración esterilizante.

La formulación farmacéutica se puede almacenar normalmente como una composición sólida, una formulación liofilizada o una solución acuosa.

Las formulaciones farmacéuticas se dosificarán y se administrarán de una manera consistente con la buena práctica médica, es decir, cantidades, concentraciones, programación, curso, vehículos y vía de administración. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los profesionales de la medicina. La "cantidad terapéuticamente efectiva" del compuesto a administrar vendrá gobernada por tales consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar el trastorno mediado por el factor de coagulación. Tal cantidad es preferiblemente inferior a la cantidad que es tóxica para el anfitrión o hace que el anfitrión sea significativamente más susceptible a la hemorragia.

Como propuesta general, la cantidad inicial farmacéuticamente efectiva de compuesto de fórmula Ia o Ib administrado por vía oral o parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 1000 mg/kg, es

decir, aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial típico del compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día. La dosis del compuesto de fórmula Ia o Ib y la dosis del agente quimioterapéutico a administrar pueden variar para cada uno de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria, o de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg por forma de dosificación unitaria. Las dosis de compuesto de fórmula Ia o Ib y el agente quimioterapéutico pueden administrarse en una proporción de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 50:1 en peso, o en una relación de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 10:1 en peso.

Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butil- o bencil- alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; iones contrarios formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los ingredientes farmacéuticos activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 18a edición, (1995) Mack Publ. Co., Easton, Pa.

Pueden obtenerse preparados de liberación sostenida de compuestos de fórmula Ia y Ib. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de fórmula Ia o Ib, las cuales matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma- etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y poli- ácido D (-) 3 hidroxibutírico.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen las adecuadas para las vías de administración que se detallan en el presente texto. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Las técnicas y formulaciones se encuentran generalmente en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ª Ed. (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de forma uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de un compuesto de fórmula Ia o Ib y/o agente quimioterapéutico adecuado para administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como píldoras, duras o blandas, por ejemplo cápsulas de gelatina, sellos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, jarabes o elixires que contienen cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de fórmula I o II y/o un agente quimioterapéutico. La cantidad de compuesto de fórmula Ia o Ib y la cantidad de agente quimioterapéutico pueden formularse en una píldora, cápsula, solución o suspensión en forma de una formulación combinada. Alternativamente, el compuesto de fórmula Ia o Ib y el agente quimioterapéutico se pueden formular separadamente en una píldora, cápsula, solución o suspensión para la administración por alternancia.

Las formulaciones pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la elaboración de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes, incluyendo agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, con el fin de proporcionar un preparado agradable al paladar. Los comprimidos prensados se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden hacer moldeando en una máquina adecuada una mezcla del ingrediente activo en polvo, humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden estar opcionalmente recubiertos o ranurados y opcionalmente se formulan para que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo del mismo.

Los excipientes de comprimidos de una formulación farmacéutica de la invención pueden incluir: carga (o diluyente) para aumentar el volumen global del fármaco en polvo que constituye el comprimido; agentes disgregantes o desintegrantes para fomentar la rotura del comprimido en pequeños fragmentos, idealmente partículas de fármaco

individuales, cuando se ingiere y se favorece la rápida disolución y absorción de los fármacos; aglutinante para asegurar que pueden formarse los gránulos y comprimidos con la resistencia mecánica requerida y que se mantiene un comprimido junto después de haber sido prensado, evitando que se fragmente en sus polvos de componentes durante el envasado, embarque y manipulación de rutina; agentes de deslizamiento para mejorar la fluidez del polvo que compone el comprimido durante la producción; lubricante para asegurar que el polvo de formación de comprimidos no se adhiere al equipo utilizado para presionar la pastilla durante la elaboración. Estos agentes mejoran el flujo de las mezclas de polvo a través de las prensas y minimizan la fricción y la rotura a medida que los comprimidos terminados son expulsados del equipo; agente antiadherente con función similar a la del agente de deslizamiento, que reduce la adhesión entre el polvo que constituye la tableta y la máquina que se utiliza para perforar la forma de la tableta durante la elaboración; agente saborizante incorporado en los comprimidos para darles un sabor más agradable o para enmascarar uno desagradable; y agente colorante para ayudar a la identificación y el cumplimiento por el paciente.

Son aceptables los comprimidos que contienen el ingrediente activo en mezcla con un excipiente no tóxico y farmacéuticamente aceptable que son adecuados para la elaboración de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato de sodio o de calcio, lactosa, fosfato de sodio o de calcio; agentes de granulación y desintegrantes como almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden ser no recubiertos o pueden ser recubiertos mediante técnicas conocidas, entre las que se incluye la microencapsulación, para retrasar la disgregación y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material retardante tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Para el tratamiento del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferiblemente en forma de pomada o crema tópica que contiene el ingrediente o los ingredientes activos en una cantidad de, por ejemplo, 0,075 a 20% p/p. Cuando se formula en una pomada, los ingredientes activos pueden emplearse con una base parafínica o bien una base de pomada miscible en agua. Alternativamente, los ingredientes activos pueden formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua.

Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir un alcohol polivalente, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo tal como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400), y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejora la absorción o la penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Entre los ejemplos de tales potenciadores de la penetración cutánea se incluyen el dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

La fase oleosa de las emulsiones de esta invención puede estar constituida por ingredientes conocidos, de una manera conocida, incluyendo una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite, o con ambas cosas, una grasa y un aceite. Preferiblemente se incluye un emulsionante hidrófilo junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizante. Juntos, el emulsionante o los emulsionantes, con o sin estabilizantes, constituyen una cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa comprenden una base de pomada emulsionante que forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de crema. Los emulsionantes y estabilizantes de la emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y lauril sulfato sódico.

Las suspensiones acuosas de las formulaciones farmacéuticas de la invención contienen los materiales activos mezclados con los excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, polioxietileno sorbitán monooleato). La suspensión acuosa puede contener también uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un preparado inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. El preparado inyectable estéril puede ser una solución o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butanodiol, o prepararse a partir de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, pueden emplearse convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite fijo suave

incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de inyectables.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una formulación de liberación con el tiempo destinada a la administración oral a personas, puede contener aproximadamente de 1 a 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material portador que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 95% de las composiciones totales (peso:peso). La composición farmacéutica puede prepararse para proporcionar cantidades fácilmente medibles para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada a la infusión intravenosa puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg de ingrediente activo por mililitro de solución, con el fin de que pueda tener lugar la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 mL/h.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones estériles para inyección acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor al que se destinan; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en el ojo también incluyen colirios en los que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. El ingrediente activo está presente en tales formulaciones preferiblemente en una concentración de aproximadamente 0,5 a 20% p/p, por ejemplo de aproximadamente 0,5 a 10% p/p, por ejemplo aproximadamente 1,5% p/p.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500 micrómetros (incluyendo tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500 micrómetros en incrementos de micrómetros tales como 0,5, 1, 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administran mediante inhalación rápida a través del conducto nasal o por inhalación a través de la boca de forma que llegue a los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol o polvo seco se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales y pueden suministrarse con otros agentes terapéuticos tales como compuestos utilizados hasta ahora en el tratamiento o profilaxis de trastornos como se describe a continuación.

Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen, además del ingrediente activo, vehículos como los que se conocen como apropiados en la técnica.

Las formulaciones se pueden envasar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiples, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyección inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se preparan a partir de polvos estériles, gránulos o comprimidos del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis diaria o una sub-dosis diaria unitaria, como se ha mencionado anteriormente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

Las composiciones veterinarias pueden comprender al menos un ingrediente activo como se ha definido anteriormente junto con un vehículo veterinario para el mismo. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que por lo demás son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, por vía oral o por cualquier otra vía deseada.

Terapia de combinación

Los compuestos de fórmula Ia y Ib se emplean en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hiperproliferativo, incluyendo tumores, cánceres y tejido neoplásico, junto con trastornos hiperproliferativos pre-malignos y no neoplásico o no malignos. En ciertas realizaciones, un compuesto de fórmula Ia o Ib se combina en una formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación como terapia de combinación, con el agente quimioterapéutico especificado. El segundo compuesto de

la formulación de combinación farmacéutica o régimen de dosificación tiene preferiblemente actividades complementarias del compuesto de fórmula Ia o Ib, y de forma que no se afecten de una manera adversa entre sí. Tales compuestos pueden administrarse en cantidades que sean eficaces para el propósito pretendido. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede comprender un compuesto de fórmula Ia o Ib, o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente quimioterapéutico como se describe en el presente texto. La combinación terapéutica se puede administrar mediante un régimen de dosificación en el que la cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula Ia o Ib es administrada en un intervalo entre dos veces al día y a una vez cada tres semanas (q3wk), y la cantidad terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico se administra en un intervalo entre dos veces al día y una vez cada tres semanas.

Las combinaciones terapéuticas de la invención incluyen un producto que comprende un compuesto de fórmula Ia o Ib, y un agente quimioterapéutico seleccionado entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib como un preparado combinado para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.

La terapia de combinación se puede administrar como un régimen simultáneo o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación puede ser administrada en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, en donde preferiblemente hay un periodo de tiempo mientras ambos agentes activos (o todos) ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente son aquellas que se utilizan actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente recién identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos, tal como aumentar el índice terapéutico o mitigar la toxicidad u otros efectos secundarios o consecuencias.

En una realización particular de la terapia anti-cancerosa, un compuesto de fórmula Ia o Ib, o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede combinarse con un agente quimioterapéutico, incluyendo agentes hormonales o de anticuerpos tales como los descritos en el presente documento, así como combinados con terapia quirúrgica y radioterapia. Tales terapias de combinación comprenden entonces la administración de al menos un compuesto de fórmula Ia o Ib, o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el uso de al menos otro método de tratamiento del cáncer. Las cantidades del compuesto o compuestos de fórmula Ia o Ib y el otro agente o los otros agentes quimioterapéuticos farmacéuticamente activos y la programación cronológica de la administración se escogerán con el fin de conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

administración de composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la condición que se ha de tratar. Las vías adecuadas incluyen la vía oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, inhalación, intradérmica, intratecal, epidural, y técnicas de infusión), transdérmica, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. La administración tópica puede implicar también el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. La formulación de fármacos se discute en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Otros ejemplos de formulaciones de fármacos se pueden encontrar en Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol 3, 2ª Ed., Nueva York, NY. Para el tratamiento inmunosupresor local, los compuestos se pueden administrar por administración intralesional, incluyendo la perfusión o poniendo en contacto de otra manera el injerto con el inhibidor antes del trasplante. Se apreciará que la vía preferida puede variar por ejemplo con la condición del receptor. Cuando el compuesto es administrado por vía oral, puede formularse como una píldora, cápsula, comprimido, etc., con un vehículo, agente de deslizamiento, o excipiente aceptable farmacéuticamente. Cuando el compuesto se administra parenteralmente, se puede formular con un vehículo o diluyente parenteral farmacéuticamente aceptable, y en una forma inyectable de dosificación unitaria, como se detalla a continuación.

Una dosis para tratar pacientes humanos puede variar de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg de compuesto de fórmula Ia o Ib. Una dosis típica puede ser de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto. Una dosis puede ser administrada una vez al día (QD), dos veces al día (BID) o más frecuentemente, dependiendo de las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD), incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto en particular. Además, los factores de toxicidad pueden influir en la dosis y en el régimen de dosificación de la administración. Cuando se administra por vía oral, la píldora, cápsula o tableta pueden ser ingeridos dos veces al día, diariamente o menos frecuentemente, como semanalmente o una vez cada dos o tres semanas por un periodo de tiempo especificado. El régimen se puede repetir durante varios ciclos de terapia.

Métodos de tratamiento

Las combinaciones terapéuticas de: (1) un compuesto de fórmula Ia o Ib y (2) un agente quimioterapéutico como se definió antes pueden ser usadas para el tratamiento de ciertos tumores. Por tanto un paciente humano puede ser tratado con una combinación terapéutica de la presente invención y un portador, coadyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el compuesto de fórmula Ia o Ib, o metabolito del mismo, de dicha combinación terapéutica está presente en cantidad para inhibir de forma detectable la actividad de PI3 cinasa.

Los tumores que son tratados de acuerdo con esta invención incluyen mama, ovario, cuello uterino, próstata, glioma, pulmón, colon, páncreas, endometrio y melanoma.

Metabolitos de compuestos de fórmula I y II

También caen dentro del alcance de esta invención los productos metabólicos *in vivo* de fórmula Ia y Ib descritos en el presente texto. Tales productos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, segmentación enzimática, y similares, del compuesto administrado. Por consiguiente, la invención incluye metabolitos de compuestos de fórmula Ia y Ib, incluyendo compuestos producidos por un proceso que comprende poner en contacto un compuesto de esta invención con un mamífero durante un período de tiempo suficiente para dar un producto metabólico del mismo.

Los productos de metabolitos se identifican típicamente preparando un isótopo radiomarcado (por ejemplo, ^{14}C o ^3H) de un compuesto de la invención, administrándolo parenteralmente en una dosis detectable (por ejemplo, mayor que aproximadamente 0,5 mg/kg) a un animal tal como una rata, ratón, cobaya, mono, o al hombre, dejando tiempo suficiente para que tenga lugar el metabolismo (típicamente aproximadamente de 30 segundos a 30 horas) y aislando sus productos de conversión de la orina, la sangre u otras muestras biológicas. Estos productos se aíslan fácilmente ya que están marcados (otros se aíslan mediante el uso de anticuerpos capaces de unirse a epítomos que sobreviven en el metabolito). Las estructuras del metabolito se determinan de manera convencional, por ejemplo mediante MS, LC/MS o análisis de RMN. En general, el análisis de metabolitos se hace de la misma manera que los estudios de metabolismo de fármacos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica. Los productos de metabolito, siempre y cuando no se encuentren de otra forma *in vivo*, son útiles en ensayos de diagnóstico para la dosificación terapéutica de los compuestos de la invención.

Artículos de fabricación

Otra realización de la invención es un "kit" que contiene los compuestos de fórmula Ia y Ib como se ha indicado antes. En una realización, el kit comprende un recipiente que comprende un compuesto de fórmula Ia o Ib, o un estereoisómero, isómero geométrico, tautómero, solvato, metabolito, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El kit puede comprender además una etiqueta o prospecto unido al envase. El término "prospecto" se utiliza en referencia a las instrucciones incluidas habitualmente en paquetes comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, envases blíster, etc. El recipiente puede estar formado de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener un compuesto de fórmula Ia o Ib o una formulación del mismo que es efectiva para tratar la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un compuesto de fórmula Ia o Ib. La etiqueta o prospecto adjunto al envase indica que la composición se usa para tratar la condición de elección, tal como el cáncer. En una realización, la etiqueta o prospecto indican que la composición que comprende un compuesto de fórmula Ia o Ib se puede utilizar para tratar un trastorno resultante del crecimiento anómalo de células. La etiqueta o prospecto puede indicar también que la composición puede utilizarse para tratar otros trastornos. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF1), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

El kit puede incluir además instrucciones para la administración del compuesto de fórmula Ia o Ib y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto de fórmula Ia o Ib y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de dichas primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente en necesidad de las mismas.

En otra realización, los kits son adecuados para el suministro de formas orales sólidas de un compuesto de fórmula Ia o Ib, tal como comprimidos o cápsulas. Tal kit incluye preferiblemente varias dosificaciones unitarias. Tales kits pueden incluir una tarjeta que tiene las dosificaciones orientadas en el orden de su uso pretendido. Un ejemplo de tal kit es un "envase blíster". Los envases blíster son bien conocidos en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas farmacéuticas de dosificación unitaria. Si se desea, se puede proporcionar

una ayuda de recordatorio, por ejemplo en forma de números, letras u otras marcas o con un prospecto de calendario, designando los días en el programa de tratamiento en el que se pueden administrar las dosis.

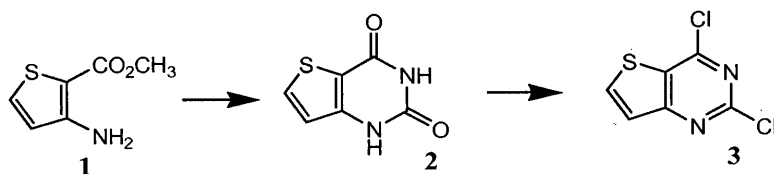
Según una realización, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un compuesto de fórmula Ia o Ib contenido en el mismo; y opcionalmente (b) un segundo recipiente con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en el que la segunda formulación farmacéutica comprende un agente quimioterapéutico como se definió antes. Alternativamente, o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Cuando el kit comprende una composición de fórmula Ia o Ib y el agente quimioterapéutico, el kit puede comprender un recipiente para contener las composiciones separadas tal como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido, sin embargo, la composiciones separadas pueden también estar contenidas dentro de un único recipiente no dividido. Típicamente, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en diferentes intervalos de dosificación, o cuando el médico responsable de la prescripción desea la titulación de los componentes individuales de la combinación.

Ejemplos

Con el fin de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos.

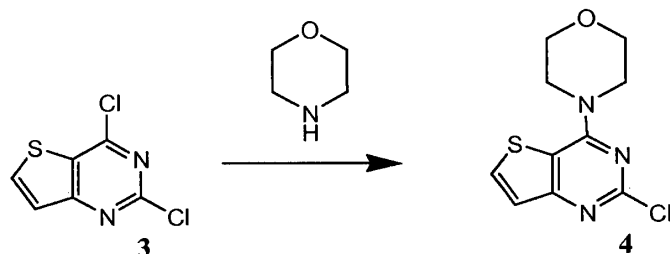
Ejemplo 1. 2,4-Dicloro-tieno [3,2-d] pirimidina **3**.



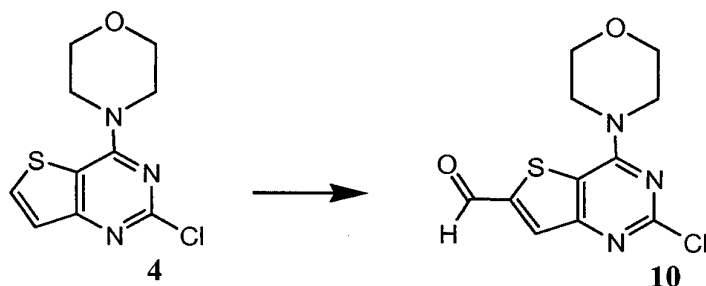
Una mezcla de 3-amino-2-tiofenocarboxilato de metilo **1** (13,48 g, 85,85 mmoles) y urea (29,75 g, 5 eq.) se calentó a 190 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción caliente se vertió sobre una solución de hidróxido sódico y se eliminó por filtración cualquier posible material insoluble. Después la mezcla se acidificó (HCl, 2 N) para dar 1H-tieno [3,2-d] pirimidina-2,4-diona **2** en forma de un precipitado blanco, que se recogió por filtración y se secó al aire (9,49 g, 66%). ¹H RMN 400 MHz, d₆-DMSO) 6,90 (1H, d, J = 5,2 Hz), 8,10 (1H, d, J = 5,2 Hz), 11,60 -11,10 (2H, br s).

Una mezcla de 1H-tieno [3,2-d] pirimidina-2,4-diona **2** (9,49 g, 56,49 mmoles) y oxicloruro de fósforo (150 mL) se calentó a reflujo durante 6 h. La mezcla de reacción se enfrió después y se vertió en hielo fundente con agitación vigorosa dando un precipitado. Después la mezcla se filtró para dar 2,4-dicloro-tieno [3,2-d] pirimidina **3** en forma de un sólido blanco (8,68 g, 75%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) 7,56 (1H, d, J = 5,5 Hz), 8,13 (1H, d, J = 5,5 Hz).

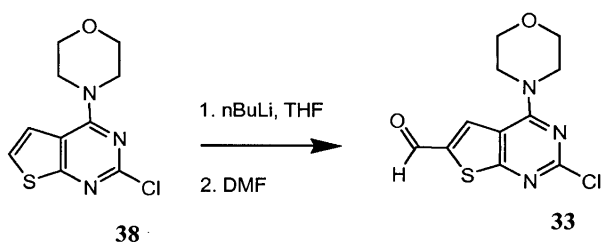
Ejemplo 2 2-Cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina **4**



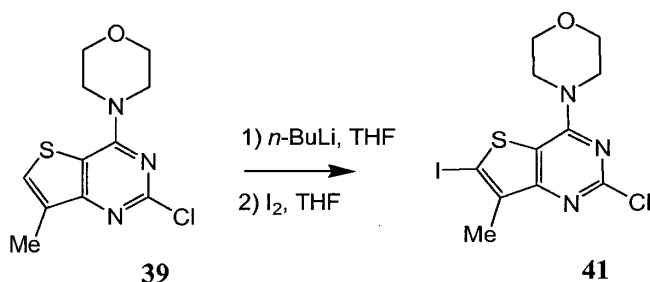
Una mezcla de 2,4-dicloro-tieno [3,2-d] pirimidina **3**, (8,68 g, 42,34 mmoles), morfolina (8,11 mL, 2,2 eq.) y MeOH (150 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Después se filtró la mezcla de reacción, y se lavó con agua y MeOH, para dar 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina **4** en forma de un sólido blanco (11,04 g, 100%). ¹H RMN (400 MHz, d₆-DMSO) 3,74 (4H, t, J = 4,9 Hz), 3,90 (4H, t, J = 4,9 Hz), 7,40 (1H, d, J = 5,6 Hz), 8,30 (1H, d, J = 5,6 Hz).

Ejemplo 3 2-Cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina-6-carbaldehído **10**.

A una suspensión de 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina **4** (1,75 g, 6,85 mmoles) en THF seco (40 mL) a -78 °C se añadió una solución 2,5 M de *n*-butil-litio (*n*BuLi) en hexano (3,3 mL, 1,2 eq.). Después de agitar durante 1 h, se añadió DMF seca (796 µL, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -78 °C y luego se calentó lentamente a temperatura ambiente. Después de otras 2 h a temperatura ambiente la mezcla de reacción se vertió sobre hielo fundente dando un precipitado amarillo. Este se recogió mediante filtración y se secó al aire para dar 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **10** (1,50 g, 77%). ¹H RMN (400 MHz, *d*₆-DMSO) 3,76 (4H, t, J = 4,9), 3,95 (4H, t, J = 4,9), 8,28 (1H, s), 10,20 (1H, s).

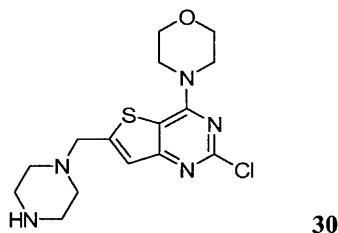
Ejemplo 3a 2-Cloro-4-morfolinotieno [2,3-d] pirimidin-6-carbaldehído **33**

A una suspensión de 2-cloro-4-morfolinotieno [2,3-d] pirimidina **38** (1,75 g, 6,85 mmoles) en THF seco (40 mL) a -78 °C se añadió una solución 2,5 M de *n*-butil-litio (*n*BuLi) en hexano (3,3 mL, 1,2 eq.). Después de agitar durante 1 h, se añadió DMF seca (796 µL, 1,5 eq.). La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a -78 °C y luego se calentó lentamente a temperatura ambiente. Al cabo de otras 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió sobre hielo fundente dando un precipitado amarillo que se recogió por filtración y se secó al aire para dar 2-cloro-4-morfolinotieno [2,3-d] pirimidina-6-carbaldehído **33** (1,50 g) MS (Q1) 284 (M⁺).

Ejemplo 3b 2-Cloro-6-yodo-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidina **41**.

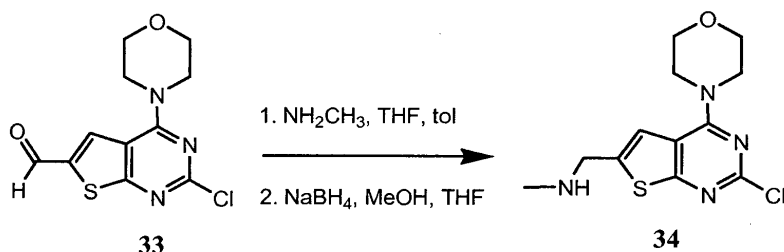
A una solución de 2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidina **39** (3,0 g, 11,1 mmoles; preparada de acuerdo con el procedimiento para la síntesis de 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina pero comenzando con éster etílico del ácido 3-amino-4-metil-tiemo-2-carboxílico) en THF (60 mL) a -78 °C se añadió BuLi (8,9 mL, 2,5 M en Et₂O). La suspensión resultante se calentó a -40 °C y se agitó durante 50 min. La mezcla de reacción se enfrió entonces a -78 °C y se añadió una solución de I₂ (5,6 g, 22,2 mmoles) en THF (30 mL). La solución se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 5 h. La reacción se apagó mediante la adición de agua. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con solución acuosa saturada de Na₂S₂O₃, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, y se concentraron bajo vacío para proporcionar 2-cloro-6-yodo-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidina **41** (3,8 g, 84% de rendimiento).

Ejemplo 3c 4- (2-Cloro-6- (piperazin-1-ilmetil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina **30**.



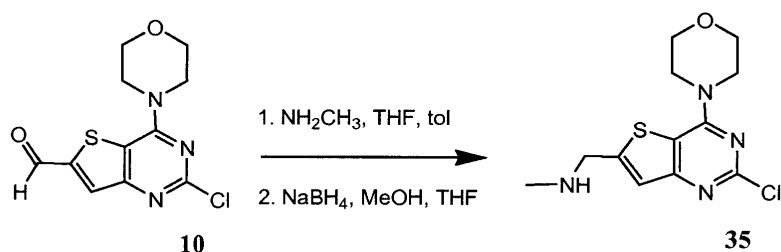
Una mezcla de 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **10** (3,5 g), 1-BOC-piperazina (2,76 g) y ortoformiato de trimetilo (4,05 mL) se agitó en 1,2-dicloroetano (300 mL) durante 1 hora a temperatura ambiente. A esto se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (3,92 g) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después la mezcla se apagó con salmuera, se extrajo con diclorometano, se secó (MgSO₄) y se eliminó el disolvente bajo vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía rápida para dar tert-butil éster del ácido 4-(2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-ilmetil)-piperazin-1-carboxílico (3,4 g). El tratamiento con HCl en diclorometano/metanol dio 4-(2-cloro-6- (piperazin-1-ilmetil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina **30**.

Ejemplo 3d (2-Cloro-4-morfolinotieno [2,3-d] pirimidin-6-il) -N-metilmetanamina **34**.



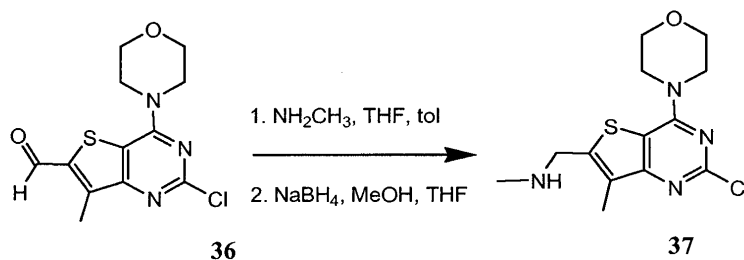
A 2-cloro-4-morfolinotieno [2,3-d] pirimidin-6-carbaldehído **33** (2,0 g) en 50 mL de tolueno y 50 mL de THF se añadieron 20 mL de metilamina al 40% en H₂O. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 24 horas. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el residuo se disolvió en 50 mL de MeOH y 50 mL de THF y el NaBH₄ se añadió en porciones. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 24 horas y la reacción completa se confirmó mediante LCMS. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía rápida (EtOAc / EtOH) para dar 1,12 g **34** (rendimiento 53%). MS (Q1) 300 (M⁺).

Ejemplo 3e (2-Cloro-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il)-N-metilmetanamina **35**.



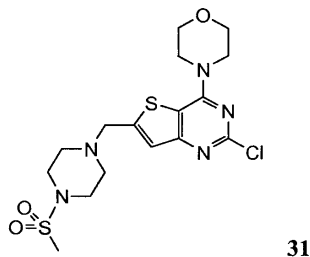
Se disolvió 2-cloro-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidina-6-carbaldehído **10** (2,0 g) en 50 mL de tolueno y 50 mL de THF seguido por la adición de 20 mL de metilamina al 40% en H₂O. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 24 horas. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el residuo se disolvió en 50 mL de metanol y 50 mL de THF y se añadió el NaBH₄ en porciones. Esta mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo N₂ durante 24 horas y la reacción completa se confirmó mediante LCMS. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el producto bruto se purificó por cromatografía rápida (EtOAc/EtOH) para dar 1,12 g **35** (rendimiento 53%). MS (Q1) 300 (M⁺).

Ejemplo 3f (2-Cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) -N-metilmetanamina **37**.



Se disolvió 2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno- [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **36** en 20 mL de tolueno y 20 mL de THF seguido por la adición de 15 mL de metilamina al 40% en H₂O, y la reacción se agitó durante 24 horas. La mezcla de reacción se concentró bajo vacío y el residuo se disolvió en 30 mL de metanol y 30 mL de THF seguido por la adición de NaBH₄. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante al menos 24 horas y la formación del producto se confirmó mediante LCMS. Los disolventes se eliminaron bajo vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía rápida para dar 2,53 g de (2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il)-N-metilmetanamina **37** (rendimiento 70%) MS (Q1) 314 (M)+.

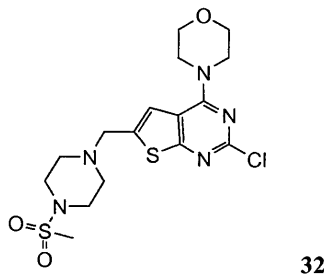
Ejemplo 4 4- (2-Cloro-6-((4- (metilsulfonil) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina **31**.



La reacción entre N-BOC-piperazina y cloruro de metanosulfonilo en diclorometano y trietilamina produjo éster terciario del ácido 4-metanosulfonil-piperazina-1-carboxílico. La segmentación del grupo protector BOC usando HCl (2 M) en diclorometano proporcionó la sal HCl de 1-metanosulfonil-piperazina.

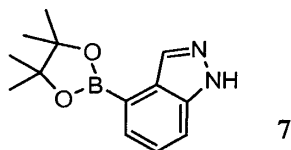
Una mezcla de 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidina-6-carbaldehído **10** (1,00 g), 1-metanosulfonil-piperazina (750 mg) y ortoformiato de trimetilo (3,80 mL) se agitó en 1,2-diclorometano (30 mL) durante 6 h a temperatura ambiente. A esto se añadió triacetoxiborohidruro sódico (900 mg) y la mezcla de reacción se agitó durante 24 h a temperatura ambiente. Después se apagó la mezcla con salmuera, se extrajo con diclorometano, se secó (MgSO₄) y el disolvente se eliminó bajo vacío. El residuo se trituró con acetato de etilo caliente para dar 4-(2-cloro-6-((4- (metilsulfonil) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina **31** en forma de un sólido blanco.

Ejemplo 5 2-Cloro-6- (4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil) -4-morfolin-4-il-tieno [2,3-d] pirimidina **32**.



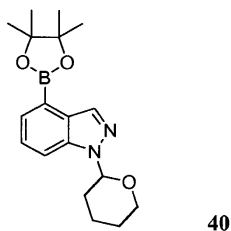
La reacción entre la sal HCl de 1-metanosulfonil-piperazina y 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [2,3-d] pirimidin-6-carbaldehído **33** usando el Procedimiento General C dio 2-cloro-6- (4-metanosulfonil-piperazin-1-ilmetil) -4-morfolin-4-il-tieno [2,3-d] pirimidina.

Ejemplo 6 4- (4,4,5,5-Tetrametil- [1,3,2] dioxaborolano-2-il) -1H-indazol 7 - Ruta 1



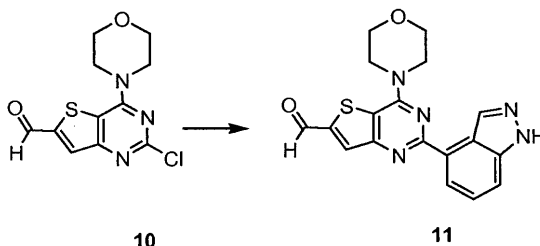
Se preparó el producto intermedio 7 de acuerdo con los métodos de los documentos US 2008/0076768, US 2008/0076758 y WO 2006/046031, incorporados al presente texto por referencia.

5 Ejemplo 8 1- (Tetrahydro-2H-piran-2-il) -4- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano-2-il)-1H-indazol **40**.



El producto intermedio **40** se preparó de acuerdo con los métodos de los documentos US 2008/0039459, US 2008/0076768, US 2008/0076758 y WO 2006/046031, que se incorporan en el presente texto por referencia.

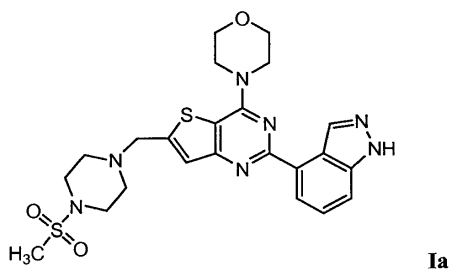
Ejemplo 10 2- (1H-Indazol-4-il)-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **11**.



10 Una mezcla de 2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **10** (100 mg, 0,35 mmoles), 4- (4,4,5,5 - tetrametil-[1,3,2] dioxaborolan-2-il)-1H-indazol (**70**) (95 mg, 0,39 mmoles) y carbonato sódico (112 mg) se suspendió en tolueno (2,5 mL), etanol (1,5 mL) y agua (0,7 mL). A esto se añadió cloruro de bis (trifenilfosfina) paladio (II) (13,5 mg) y el recipiente de reacción se purgó con argón. La mezcla de reacción se sometió a microondas a 120 °C

15 durante 1 h y después se repartió entre DCM y agua, la capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó bajo vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía rápida para dar 2-(1H-indazol-4-il) -4-morfolin-4-il-tieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído **11** (97 mg).

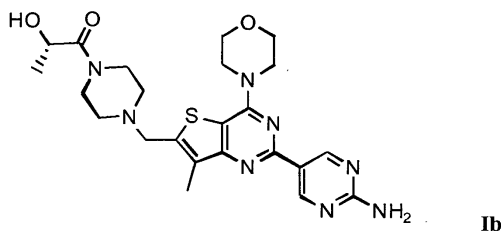
Ejemplo 11 4-(2-(1H-Indazol-4-il)-6- ((4- (metilsulfonyl) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina (fórmula **1a**, GDC-0941):



20 Una mezcla de 4-(2-cloro-6 (4-(metilsulfonyl) piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina **31** del Ejemplo 4 (2,00 g), 4-(4,4,5,5-tetrametil [1,3,2] dioxaborolan-2-il) -1H-indazol **7** (2,26 g), tolueno (24 mL), etanol (12 mL), agua (6 mL), carbonato sódico (1,72 g) y PdCl₂ (PPh₃)₂ (325 mg) se calentó a 130 °C en microondas durante 90 minutos (documentos US 2008/0076768 y WO 2006/046031, incorporados por referencia en el presente texto).

La mezcla de reacción se enfrió, se diluyó con cloroformo, se lavó con salmuera, se secó (MgSO₄) y el disolvente se eliminó bajo vacío. El residuo se purificó usando cromatografía rápida (acetato de etilo, después 5% de acetato de etilo/metanol), y luego la trituración con éter proporcionó el compuesto de fórmula **1a**, GDC-0941 (1,4 g). Datos de MS: (ESI+): MH⁺ 514. Datos de RMN: (CDCl₃): 2,67 - 2,71 (4H, m), 2,81 (3H, s), 3,29 - 3,33 (4H, m), 3,89 (2H, s), 3,89 - 3,93 (4H, m), 4,8 - 4,12 (4H, m), 7,41 (1H, s), 7,51 (1H, t, J = 7,2), 7,60 (1H, d, J = 8,3), 8,28 (1H, d, J = 7,5), 9,02 (1H, s), 10,10 (1H, br).

Ejemplo 12 (S)-1-(4-((2- (2-aminopirimidin-5-il) -7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona (fórmula **1b**)



Se hizo reaccionar 2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-carbaldehído (495 mg) con Boc-piperazina a través del Procedimiento General B-3 para dar 4-((2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) metil) piperazina-1-carboxilato de terc-butilo.

El 4 - ((2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) metil)-piperazina-1- carboxilato de terc-butilo (777 mg) se sometió al Procedimiento General E para dar la sal HCl de 2-cloro-7-metil-4-morfolino-6-((piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidina. La sal HCl de 2-cloro-7-metil-4-morfolino-6 - ((piperazin-1-il) metil) tieno [3,2-d] pirimidina (590 mg) se hizo reaccionar con ácido láctico a través del Procedimiento General B-2 para dar (S)-1-(4-((2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona.

El (S) -1-(4-((2-cloro-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d] pirimidin-6-il) metil) piperazin-1-il) -2 -hidroxiopropan-1-ona (60 mg) se hizo reaccionar con 50 mg de 5- (4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il) pirimidin-2-amina a través del Procedimiento General A-2 para dar 10 mg de la fórmula **1b** (documento WO 2008/070740, incorporado por referencia). MS (Q1) 499,3 (M)⁺.

Ejemplo 13 Ensayo de unión p110α (alfa) PI3K.

Ensayos de unión: Se realizaron experimentos de polarización inicial en un aparato Analyst HT 96-384 (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA). Las muestras para las medidas de afinidad de polarización de fluorescencia fueron preparadas mediante la adición de diluciones 1: 3 en serie de p110α PI3K a partir de una concentración final de 20 µg/mL en tampón de polarización (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 4 mM, 0,05% Chaps, y DTT 1 mM) a PIP₂ 10 mM (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT) de concentración final. Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se pararon mediante la adición de GRP-1 y sonda PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) 100 nM y 5 nM de concentración final, respectivamente. La lectura con filtros de corte estándar para el fluoróforo rodamina (λ_{ex} = 530 nm; λ_{em} = 590 nm) en Proxiplates de bajo volumen negros de 384 pocillos (Perkin Elmer, Wellesley, Mass) Los valores de polarización de fluorescencia se representaron en función de la concentración de proteína, y los valores de EC₅₀ se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de 4 parámetros utilizando el software KaleidaGraph (software Synergy, Reading, PA). Este experimento también establece la concentración de proteína apropiada para su uso en subsiguientes experimentos de competición con inhibidores.

Los valores de IC₅₀ del inhibidor se determinaron mediante la adición de 0,04 mg/mL de p110α PI3K (concentración final) combinado con PIP₂ (10 mM de concentración final) a los pocillos que contienen diluciones 1:3 en serie de los antagonistas en una concentración final de 25 mM ATP (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) en el tampón de polarización. Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron mediante la adición de GRP-1 y sonda PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) 100 nM y 5 nM de concentración final respectivamente. Lectura con filtros de corte estándar para el fluoróforo rodamina (λ_{ex} = 530 nm; λ_{em} = 590 nm) en placas proxi de bajo volumen negros de 384 pocillos (PerkinElmer, Wellesley, MA.) Los valores de polarización de fluorescencia se representaron en función de la concentración de antagonista, y los valores de IC₅₀ se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de 4 parámetros en el software Assay Explorer (MDL, San Ramon, CA.).

Alternativamente, la inhibición de PI3K se determinó en un ensayo radiométrico utilizando enzima recombinante purificada y ATP a una concentración de 1 µM. El compuesto se diluyó en serie en DMSO al 100%. La reacción de la cinasa se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, y la reacción se terminó mediante la adición de PBS. Los

valores de IC₅₀ se determinaron subsiguientemente usando ajuste de la curva dosis-respuesta sigmoidal (pendiente variable).

Ejemplo 14 Ensayo de proliferación de células in vitro.

La eficacia de los compuestos de fórmula Ia o Ib se midió mediante un ensayo de proliferación de células empleando el siguiente protocolo (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al (2002) Cancer Res. 62: 5485 - 5488.). Los reactivos y el protocolo del ensayo Cell-Titer Glo están disponibles comercialmente (Promega). El ensayo establece la capacidad de los compuestos para alcanzar las células e inhibir la proliferación celular. El principio del ensayo es la determinación del número de células viables presentes mediante la cuantificación del ATP presente. Cell-Titer Glo es el reactivo usado para esta cuantificación. Es un ensayo homogéneo en el que la adición del Cell-Titer Glo tiene por resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente a través de la reacción de la luciferasa. La señal luminiscente es proporcional a la cantidad de ATP presente.

Células: véase figuras 1A-C para las líneas de células y tipo de tumor.

Placas de DMSO y medio: placas de polipropileno de fondo cónico de 96 pocillos de Nunc (Cat nº 249946)

Placas de células: placas TC fondo claro (MicroClear) negras de 384 pocillos con tapa de Falcon (353962)

Medio de cultivo celular: RPMI o DMEM alto en glucosa, 10% suero bovino fetal, L-glutamina 2 mM, P/S

Cell Titer-Glo: Promega (Cat nº G7572)

Procedimiento:

Día 1 – Se siembran las placas de células, se recogen las células, se siembran las células PC3 a razón de 1000 células por 54 µl por pocillo en placas de células de 384 pocillos para el ensayo de 3 días. Se incuba O/N a 37 °C, 5% de CO₂.

Día 2 – Se añade fármaco a las células, dilución del compuesto, placas DMSO (serie 1: 2 para 9 puntos), se añade 20 µl de compuestos a 10 mM en la 2ª columna de la placa de 96 pocillos. Se realiza serie 1: 2 a través de la placa (10 µl + 10 µl 100% DMSO) para un total de 9 puntos usando precisión. Placas de medio (dilución 1:50) Añadir 147 µl de medio en todos los pocillos. Transferencia 3 µl de DMSO + compuesto de cada pocillo en la placa de DMSO a cada correspondiente pocillo en la placa de medio utilizando Rapidplate. Para estudios combo de 2 fármacos, transferir un fármaco 1,5 µl de DMSO + compuesto de cada pocillo en la placa de DMSO a cada pocillo correspondiente en Placa de Medio utilizando Rapidplate. Después, transferir otro fármaco 1,5 µl a la placa de medio.

Adición de fármaco a las células, placa de células (dilución 1:10), Añadir 6 µl de medio + compuesto directamente a las células (54 µl de medio sobre las células ya). Incubar 3 días a 37 °C, 5% de CO₂ en una incubadora que no se abrirá con frecuencia.

Día 5 – Desarrollo de las placas, descongelar el tampón Cell Titer Glo Buffer a temperatura ambiente. Retirar las placas de células de 37 °C y equilibrar a temperatura ambiente, durante 30 aproximadamente minutos. Añadir tampón Cell Titer Glo a sustrato Cell Titer Glo (botella a botella). Añadir 30 µl reactivo Cell Titer Glo a cada pocillo de células. Colocar en un agitador de placas durante aproximadamente 30 minutos. Leer luminiscencia en el lector de placas Analyst HT (medio segundo por pocillo).

Ensayos de viabilidad celular y ensayos de combinación: Las células se sembraron a razón de 1000 a 2000 células por pocillo en placas de 384 pocillos durante 16 h. En el segundo día, se hicieron nueve diluciones del compuesto 1: 2 en serie en DMSO en una placa de 96 pocillos. Los compuestos se diluyeron más en medio de cultivo utilizando un robot Rapidplate (Zymark Corp., Hopkinton, MA). Los compuestos diluidos se añadieron después a pocillos por cuadruplicado en placas de células de 384 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Al cabo de 4 días, los números relativos de células viables se midieron por luminiscencia usando Cell-Titer Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron en un lector Wallac Multilabel (PerkinElmer, Foster City). Los valores de EC₅₀ se calcularon usando el software Prism 4.0 (GraphPad, San Diego). Los fármacos en los estudios de combinación se dosificaron a partir de concentraciones 4x EC₅₀. Si los casos en que la EC₅₀ del fármaco era > 2,5 µM, la concentración más alta utilizada fue de 10 µM. Los inhibidores de PI3K y los agentes quimioterapéuticos se añadieron simultáneamente o separados por 4 horas (uno antes que el otro) en todos los ensayos.

Un ejemplo adicional en el ensayo de proliferación de células in vitro incluye las siguientes etapas:

1. Una parte alícuota de 100 µl de cultivo de células que contiene aproximadamente 10⁴ células (véanse las figuras 1A - C para las líneas de células y tipo de tumor) en medio, fue depositada en cada pocillo de una de paredes opacas de 384 pocillos.

2. Se prepararon pocillos de control que contienen medio y sin células.
3. El compuesto se añadió a los pocillos experimentales y se incubó durante 3 - 5 días.
4. Las placas se equilibraron a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.
5. Se añadió un volumen de CellTiter-Glo reactivo igual al volumen de medio de cultivo celular presente en cada pocillo.
6. Los contenidos se mezclaron durante 2 minutos en un agitador orbital para inducir la lisis celular.
7. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.
8. La luminiscencia se registró y se expresó en gráficos como RLU = unidades de luminiscencia relativas.

Alternativamente, las células se sembraron a una densidad óptima en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 4 días en presencia de compuesto de ensayo. Posteriormente se añadió Alamar Blue™ al medio de ensayo, y las células se incubaron durante 6 h antes de leer a 544 nm de excitación, 590 nm de emisión. Los valores de EC₅₀ se calcularon usando un ajuste de curva sigmoidal de respuesta a la dosis.

Ejemplo 15 Ensayo de Anexina V/PI FACS.

Las células (2×10^6) se pusieron en una placa de cultivo de tejido de 10 cm. Al cabo de 16 horas, las células fueron expuestas a 0,1% de DMSO (control) o fórmula Ia (que contiene 0,1% de DMSO) durante 48 horas. Después las células se eliminaron de la placa utilizando tripsina y se lavaron una vez con PBS. Para detectar la apoptosis, las células (MB361, PC3) se resuspendieron en tampón para unión (10 mM Hepes/NaOH [pH 7,4], NaCl 140 mM, y CaCl₂ 2,5 mM) a razón de 1×10^6 células/mL e inmediatamente fueron teñidas con 5 µl de anexina V-FITC (BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ) y 500 µl de solución de yoduro de propidio (PI) que contiene 50 mg/mL de PI (Sigma), 0,2 mg/mL de solución de RNasa (Sigma), y 0,1% de Triton-X (Sigma) en PBS. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y las células se analizaron con un citómetro de flujo (BD Biosciences; San José, CA).

Ejemplo 16 Morfogénesis acinar en cultivo 3D de células HER2 + BT474M1.

La actividad biológica de los inhibidores de PI3K y las combinaciones terapéuticas más eficaces de los inhibidores de la familia PI3K y HER en células de cáncer de mama HER2-amplificado se determinaron en cultivos de células en 3D realizado usando el método de superposición de capa. El compuesto de fórmula Ia se utilizó como una suspensión en dimetilsulfóxido a una concentración de 50 mM. Se proporcionó heregulina beta-1₁₇₇₋₂₄₄ (en lo sucesivo denominado HRG) a una concentración de almacenamiento de 225,8 µM. Las células BT474M1 fueron tratadas con 20 µg/mL de trastuzumab, 25 µg/mL de pertuzumab, compuesto de fórmula Ia 250 nM, o compuesto de fórmula IIa 250 nM en cultivo 3D. La viabilidad de las células se determinó midiendo los niveles de ATP celular utilizando el ensayo de viabilidad de celular luminiscente Cell Titer Glo (Promega). Las lecturas se basaron en el promedio de 3 replicados por cada condición de ensayo. La morfogénesis se cuantificó calculando el alcance de la formación de brote de imágenes de contraste de fase. 100 ácinos en cada condición de ensayo, típicamente 9 días de duración, fueron puntuados en relación con el número de brotes formados en la superficie acinar. El medio de cultivo se refresca cada 3 días.

En una curva de titulación, las células BT474M1 fueron tratadas con dosis crecientes de fórmula Ia para determinar una concentración óptima que inhibió efectivamente los marcadores aguas abajo de PI3K (AKT) y condujo a una disminución global de la viabilidad celular (Cell Titer -Glo). Las células BT474M1 fueron derivadas de una línea celular progenitora BT474 adquirida a través de la American Type Culture Collection. Las células se pasaron por ratones para obtener una línea celular dependiente de estrógenos viable adecuada para estudios in vitro e in vivo.

Todos los ensayos 3D se realizaron usando el "método de superposición" como se describe (Lee et al (2007) Nat. Methods 4: 359-65). Se recubrieron uniformemente placas de cuarenta y ocho pocillos con 100 µl de Matrigel con factor de crecimiento reducido (BD Biosciences) en hielo. Las placas se transfieren posteriormente a un incubador a 37°C durante 20 minutos para permitir la polimerización de la matriz. Se recolectaron células BT474M1 y 10.000 células/pocillo fueron sembradas en placas recubiertas con Matrigel. Las células se cultivaron en medio de crecimiento suplementado con 5% de Matrigel y los correspondientes fármacos o ligando. Los ensayos eran típicamente de 9 - 10 días de duración, y el medio de crecimiento fue reemplazado cada 3 días. Se registraron imágenes de contraste de fase con una cámara digital Sony (DXC-S500) adaptada a un microscopio Leica DMIL. La viabilidad celular se determinó midiendo los niveles de ATP celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titer Glo (Promega). Las lecturas se evaluaron mediante un luminómetro y se basaron en el promedio de 3 replicados por cada condición de ensayo. La morfogénesis se cuantificó calculando el alcance de la formación de brotes de imágenes de contraste de fase. 100 ácinos en cada condición de ensayo fueron puntuados

en relación con el número de brotes formados en la superficie acinar. Las puntuaciones se totalizaron y se agruparon en categorías de 0 – 1, 2 – 3 o ≥ 4 brotes por ácino.

Tabla 1 Combinaciones de inhibidor PI3K evaluadas en cultivo 3D de células

	Combinaciones	Diana (s)
1	20 µg de trastuzumab Fórmula la 250 nM	Her2 (subdominio extracelular IV) PI3K
2	25 µg de pertuzumab Fórmula la 250 nM	Her2 (subdominio extracelular II) PI3K
3	20 µg de trastuzumab 25 µg de pertuzumab Fórmula la 250 nM	Her2 (subdominio extracelular II) Her2 (subdominio extracelular IV) PI3K

5 Ejemplo 17 Xenoinjerto de tumor in vivo.

- Se pueden obtener animales adecuados para experimentos transgénicos de fuentes comerciales estándar. Grupos de ratones atímicos CD-1 hembra (Charles River Laboratory) se implantaron subcutáneamente en el flanco trasero con 20 millones de células de cáncer de mama MDA -MB-361.1 (mutante PI3K) con matrigel y 0,36 mg de implantes de estrógeno por ratón. Grupos de ratones nu/nu NMRI (Janvier) fueron implantados con fragmentos de 150 mm³ de MaxF 401 (Her2+/ER+/PR+) o tumores primarios de mama MAXF 1162 (Her2+/ER+ PR+) (obtenidos directamente por biopsia de dos pacientes con cáncer de mama individuales) con matrigel y 0,36 mg de pellets de estrógenos por ratón. Grupos de nu/nu HRLN hembra (Harlan Labs) fueron implantados con 10 millones de células de cáncer de mama MCF-7 (mutante PI3K) con matrigel y 0,36 mg de pellets de estrógeno por ratón. Grupos de ratones nu/nu atímicos hembra (Charles River Laboratory) fueron implantados con 15 millones de células de cáncer de pulmón no microcítico NCI-H2122 (K-Ras mutante) y matrigel por ratón. Los xenoinjertos de ratón se dosificaron el día 1 con fármaco, combinación de fármacos, o vehículo de acuerdo con el programa especificado para cada modelo de tumor. El docetaxel fue administrado por vía intravenosa, el B20-1.4 se administró por vía intraperitoneal y la fórmula la fue suministrada por boca mediante sonda. Los tamaños de los tumores se registraron dos veces por semana en el curso del estudio. Los pesos corporales del ratón también se registraron dos veces por semana, y los ratones se observaron regularmente. El volumen del tumor se midió en dos dimensiones (longitud y anchura) usando calibres Ultra Cal-IV (Modelo 54-10-111; Fred V. Fowler Co., Inc.; Newton, MA) y se analizaron usando Excel v.11.2 (Microsoft Corporation; Redmond, Washington). Se obtuvieron gráficos de inhibición tumoral usando KaleidaGraph, versión 3.6 (Synergy Software, Reading, PA). El volumen tumoral se calculó con la fórmula: Tamaño del tumor (mm³) = (medida más larga x medida más corta²) x 0,5.
- Los pesos corporales de los animales se midieron utilizando una escala Adventurera Pro AV812 (Ohaus Corporation; Pine Brook, NJ). Los gráficos se generaron utilizando KaleidaGraph versión 3.6. Se calculó el porcentaje de cambio de peso utilizando la fórmula: Porcentaje de cambio de peso del grupo = (1- (peso inicial / nuevo peso)) x 100.
- Los ratones cuyo volumen tumoral superó 2.000 mm³ o cuya pérdida de peso fue más del 20% de su peso inicial fueron sacrificados sin demora de acuerdo con las normas.
- La inhibición del porcentaje de crecimiento tumoral (% INH) al final del estudio (EOS) se calculó utilizando la fórmula: % INH = 100 x (volumen medio EOS de los tumores en los animales que recibieron vehículo - volumen medio EOS de los tumores en los animales que recibieron fármaco) / volumen medio EOS de los tumores en los animales que recibieron vehículo.
- La incidencia tumoral (TI) se determinó basándose en el número de tumores medibles que quedan en cada grupo al final del estudio. Una respuesta parcial (PR) se definió como una reducción mayor que el 50% pero menor que el 100% en el volumen del tumor, en comparación con el volumen inicial del tumor, observado en cualquier día del estudio. Una respuesta completa (CR) se definió como una reducción del 100% del volumen del tumor, en comparación con el volumen inicial del tumor, observado en cualquier día del estudio. Los datos se analizaron y los valores de p se determinaron usando el test de Dunnett con software estadístico JMP, versión 5.1.2 (SAS Institute; Cary, NC). Los valores de los volúmenes tumorales individuales al final del estudio y el volumen medio del tumor $\pm$ SEM se calcularon usando el software estadístico JMP, versión 5.1.2. Los datos de peso corporal se representaron gráficamente basándose en el porcentaje medio de cambio de los pesos corporales iniciales $\pm$ SEM.

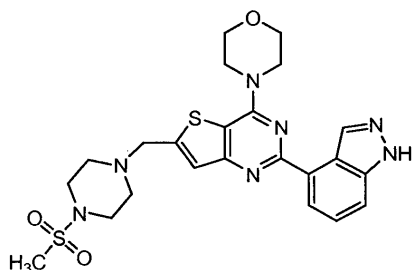
Ejemplo 18 Ensayo de inducción fosfo AKT.

- En una placa de cultivo de tejido de 6 pocillos se sembraron células a razón de 5×10^5 células por pocillo durante la noche. Las células fueron tratadas con una EC₈₀ de agente quimioterapéutico. Después del tratamiento, las células se lavaron una vez con PBS frío y se lisaron en 1 x tampón de extracción de células de Biosource (Carlsbad, CA) suplementado con inhibidores de proteasa (Roche, Mannheim, Alemania), PMSF 1 mM, y Cócteles de Inhibidor de

fosfatasa 1 y 2 de Sigma (St. Louis, MO). La determinación de la concentración de proteína se realizó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Rockford, IL). Los niveles de pAkt (Ser⁴⁷³) y Akt total se evaluaron utilizando kits de esferas de Biosource (Carlsbad, CA) y el sistema Luminex Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA).

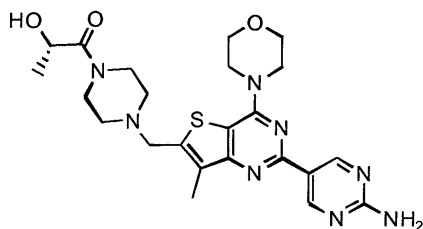
REIVINDICACIONES

1. Una combinación terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonyl)piperazin-1-il)metil)tieno [3,2-d]pirimidin-4-il) morfolina, que tiene la fórmula Ia:



Ia;

(S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona, que tiene la fórmula Ib



Ib;

y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; y una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib; en donde la combinación terapéutica tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de tipo tumoral, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC50 obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro* y siendo elegido el tipo de tumor entre tumores de mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y de próstata.

2. Una combinación según la reivindicación 1ª, en la que la sal aceptable farmacéuticamente del compuesto de fórmula Ia o Ib se elige entre una sal formada con ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido fórmico, ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido etanosulfónico, ácido aspártico y ácido glutámico.

3. Una combinación según la reivindicación 1ª o 2ª, que está en forma de una formulación combinada.

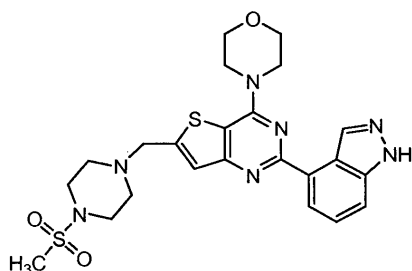
4. Una combinación según la reivindicación 3ª, que comprende un agente de deslizamiento aceptable farmacéuticamente elegido entre dióxido de silicio, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, estearatos metálicos, aluminosilicato sódico, benzoato sódico, carbonato cálcico, silicato cálcico, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco libre de amianto, stearowet C, almidón, almidón 1500, laurilsulfato de magnesio, óxido de magnesio y combinaciones de los mismos.

5. Una combinación según la reivindicación 1ª o 4ª, en la que el compuesto y el agente quimioterapéutico comprenden cada uno de ellos una cantidad de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg por forma de dosificación unitaria.

6. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para ser usada en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo que es el cáncer escogido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, páncreas y próstata.

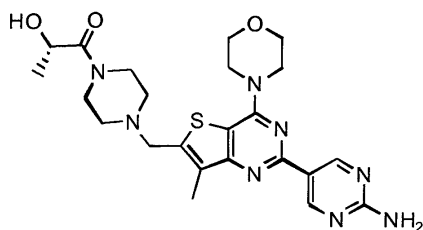
7. Una combinación para ser usada según la reivindicación 6ª, en la que el cáncer se elige entre el cáncer de mama y el cáncer de pulmón.

8. Una combinación para ser usada según la reivindicación 6ª, en la que el cáncer expresa un K-ras mutante.
 9. Una combinación para ser usada según la reivindicación 8ª, en la que la combinación comprende fórmula la y docetaxel.
 10. Un kit que comprende
- 5 a) una combinación farmacéutica como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, y
- b) instrucciones para su uso en el tratamiento de un tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, páncreas y próstata.
11. Un producto que comprende un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il) metil) tieno [3,2 -d] pirimidin-4-il) morfolina que tiene la fórmula la:



Ia;

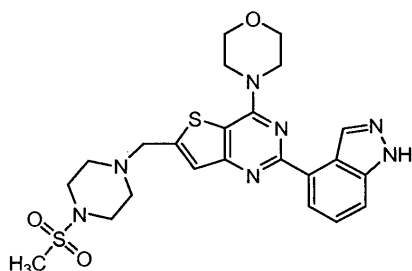
(S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona ,que tiene la fórmula Ib:



Ib;

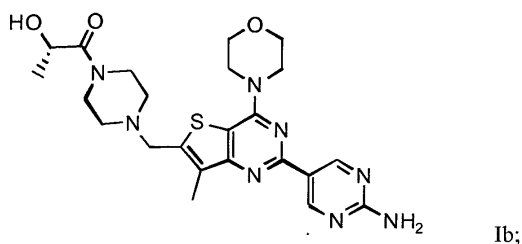
y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; y un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib; como una formulación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de un tipo de tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y próstata; en donde la combinación de dicho compuesto y dicho agente quimioterapéutico tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de un tipo de tumor como se define antes, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC₅₀ obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

12. Un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)metil)tieno[3,2-d]pirimidin-4-il) morfolina que tiene la fórmula la:



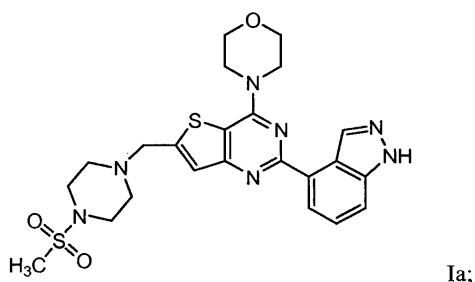
Ia;

(S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona, que tiene la fórmula Ib:

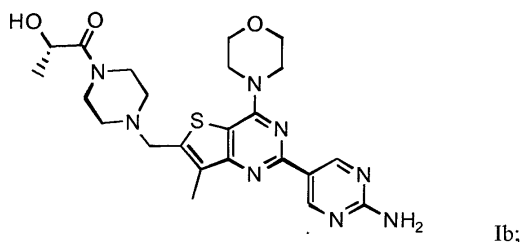


y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; para su uso en combinación con un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib para el tratamiento de un tipo de tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y próstata; en donde la combinación de dicho compuesto y dicho agente quimioterapéutico tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de un tipo de tumor como se define antes, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC_{50} obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

13. Un agente quimioterapéutico elegido entre erlotinib, docetaxel, 5-FU, gemcitabina, PD-0325901, cisplatino, carboplatino, paclitaxel, bevacizumab, trastuzumab, pertuzumab, temozolomida, tamoxifeno, doxorubicina, Akti-1/2, HPPD, rapamicina, y lapatinib para su uso en combinación con un compuesto elegido entre 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil) piperazin-1-il)metil) tieno [3,2-d] pirimidin-4-il) morfolina que tiene la fórmula Ia:



(S)-1-(4-((2-(2-aminopirimidin-5-il)-7-metil-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil) piperazin-1-il) -2-hidroxiopropan-1-ona que tiene la fórmula Ib:



y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros o sales de los mismos aceptables farmacéuticamente; para el tratamiento de un tipo de tumor elegido entre mama, cervical, colon, endometrio, glioma, pulmón, melanoma, ovario, pancreático y próstata; en donde la combinación de dicho compuesto y dicho agente quimioterapéutico tiene una puntuación de CI (índice de combinación) inferior a 0,8 en una línea de células de un tipo de tumor como se define antes, siendo calculada la puntuación del CI por el método de Chou y Talalay a partir de los valores de EC_{50} obtenidos en un ensayo de proliferación celular *in vitro*.

Ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ia (GDC-0941) y varios agentes quimioterapéuticos.

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. Quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto Ia	Índice de combinación (CI)	Sinergia
1	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	5-FU	> 40	0,48	0,048	++++
2	MT3	mama	K-ras G 12D PI3K H1047R	5-FU	> 40	0,58	0,954	+/-
3	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	5-FU	> 40	0,82	0,757	++
4	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	5-FU	20	0,87	0,674	+++
5	ZR75-1	mama	PTEN neg	5-FU	20	0,3	0,682	+++
6	Cal-120	mama		5-FU	1,33	1,38	1,33	-
7	HCC-1589	mama	PTEN neg	carboplatino	> 40	0,322	1,1	-
8	HCC-1589	mama	PTEN neg	docetaxel	0,0004	0,322	0,737	++
9	MDA-MB-361	mama		docetaxel	0,016	0,48	0,11	++++
10	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	docetaxel	0,05	0,87	0,136	++++
11	ZR75-1	mama	PTEN neg	docetaxel	0,0025	0,3	0,901	+/-
12	MT3	mama	K-ras G 12D, PI3K H1047R	docetaxel	0,001	0,58	0,278	++++
13	MCF7	mama	PI3K E545K	docetaxel	0,005	0,17	0,866	+
14	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	docetaxel	0,005	0,82	0,346	+++
15	Cal-120	mama		docetaxel	0,85	1,38	0,85	+
16	MDA-MB-231	mama	K-ras G 13G	docetaxel	0,0001	6,5	0,96	-
17	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	doxorubicina	0,148	0,48	0,137	++++
18	Cal-51	mama	PI3K E542K, PTEN neg	gemcitabina	0,002	0,76	0,189	++++
19	Cal-120	mama		gemcitabina	0,4	1,38	0,4	+++
20	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	gemcitabina	0,006	0,48	0,421	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. Quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
21	MT3	mama	K-ras G12D PI3K H1047R	gemcitabina	0,002	0,58	0,863	+
22	MCF7	mama	PI3K E545	gemcitabina	0,005	0,17	0,651	+++
23	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	gemcitabina	0,001	0,82	0,959	+/-
24	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	gemcitabina	0,0025	0,87	0,722	++
25	ZR75-1	mama	PTEN neg	gemcitabina	0,01	0,3	0,655	+++
26	BT474	mama	PI3K K111N	lapatinib	0,1	0,52	0,22	++++
27	EFM192A	mama	PI3K C420R	lapatinib	0,31	0,41	0,24	++++
28	MDA-MB-231	mama	K-ras G12D	paclitaxel	0,0017	6,5	1,1	-
29		mama	PI3K E542k PTEN neg	PD-0325901	0,37	0,76	0,109	++++
30	MDA-MB-361	mama	PI3K E545	PD-0325901	> 2	0,48	0,275	++++
31		mama	PI3K E545	PD-0325901	> 20	0,17	0,95	+/-
32		mama	K-ras G12D PI3K H1047R	PD-0325901	0,023	0,58	0,01	++++
33	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	PD-0325901	2	0,82	0,092	++++
34		mama	PTEN neg	PD-0325901	0,36	0,13	0,779	++
35	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	PD-0325901	0,27	0,87	0,114	++++
36		mama	PI3K E545K	tamoxifeno	> 10	0,17	0,353	+++
37	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	rapamicina	0,01	0,55	0,29	++++
38	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	Akti-1/2	3,73	0,55	0,57	+++
39	MDA-MB-453	mama	PI3K H1047R	rapamicina	0,01	0,40	0,37	+++
40	MDA-MB-453	mama	PI3K H1047R	Akti-1/2	1,90	0,40	0,42	+++
41	T47D	mama	PI3K H1047R	rapamicina	0,01	0,17	0,39	+++
42	T47D	mama	PI3K H1047R	Akti-1/2	0,28	0,17	0,97	+/-
43	zr75-1	mama	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,33	0,47	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Indice de combinación (CI)	Sinergia
44	ZR75-1	mama	PTEN neg	Akti-1/2	6,05	0,33	0,67	++
45	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	rapamicina	0,01	1,73	0,24	++++
46	MDA-MB-468	mama	PTEN neg	Akti-1/2	17,62	1,73	0,60	++++
47	BT549	mama	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,28	0,23	++++
48	BT549	mama	PTEN neg	Akti-1/2	16,81	0,28	0,58	+++
49	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,82	0,37	+++
50	MDA-MB-436	mama	PTEN neg	Akti-1/2	17,38	0,82	0,90	+
51	HCC1937	mama	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,70	0,35	+++
52	HCC1937	mama	PTEN neg	Akti-1/2	10,19	0,70	0,69	++
53	SKBR3	mama	p53 mut	rapamicina	0,01	0,26	0,30	++++
54	SKBR3	mama	p53 mut	Akti-1/2	2,21	0,26	0,71	++
55	SKBR3	mama	p53 mut	lapatinib	0,07	0,33	0,66	++
56	MDA-MB-175	mama	p53 mut	rapamicina	0,01	0,42	0,32	+++
57	MDA-MB-175	mama	p53 mut	Akti-1/2	1,43	0,42	0,67	++
58	Hs587T	mama	p53 mut	rapamicina	0,01	0,58	0,37	+++
59	Hs587T	mama	p53 mut	Akti-1/2	20	0,86	0,82	++
60	HDQ-P1	mama		rapamicina	0,01	0,49	0,52	+++
61	HDQ-P1	mama		Akti-1/2	4,69	0,49	0,98	+/-
62	C-33A	cervical	PTEN neg	5-FU	3,84	1,2	0,77	++
63	ME-180	cervical	PI3K E545K	5-FU	4	0,32	0,88	+
64	SiHa	cervical		5-FU	47	2,5	1,23	-
65	C-33A	cervical	PTEN neg	docetaxel	0,001	1,2	0,53	++
66	ME-180	cervical	PI3K E545K	docetaxel	0,0017	0,32	0,66	++
67	SiHa	cervical		docetaxel	0,0025	2,5	0,85	+

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
68	C-33A	Cervical	PTEN neg	gemcitabina	0,0025	1,2	0,72	++
69	ME-180	Cervical	PI3K E545K	gemcitabina	0,035	0,32	0,55	+++
70	SiHa	Cervical		gemcitabina	0,0025	2,5	0,6	++
71	SW620	Colon	K-ras G12V, p53 mut	erlotinib	> 10	1,25	0,115	++++
72	KM12	Colon	PTEN neg	erlotinib	> 10	3,46	1,094	+/-
73	WiDR	Colon		erlotinib	> 10	0,27	1,1	-
74	SW620	Colon	K-ras G12V, p53 mut	PD-0325901	0,01	1,25	0,37	+++
75	HT-55	Colon		PD-0325901	0,05	0,27	0,093	+++++
76	KM12	Colon	PTEN neg	PD-0325901	> 2	3,46	0,061	+++++
77	WiDR	Colon		PD-0325901	0,05	0,27	0,093	+++++
78	HCT-116	Colon	K-ras G12V	PD-0325901	0,13	1,16	0,03	+++++
79	DLD-1	Colon	K-ras G12V	PD-0325901	0,70	1,21	0,007	+++++
80	RKO	Colon	PI3K E545K					
			B-raf V600E, PI3K H1047K	PD-0325901	0,07	1,66	0,08	+++++
81	Colo205	Colon	B-raf V600E, PI3K H1047K	PD-0325901	0,006	2,14	0,10	++++
82	HT-29	Colon		PD-0325901	0,03	0,45	0,20	++++
83	LoVo	Colon	K-ras G13D	PD-0325901	0,009	0,45	0,20	++++
84	HCT-116	Colon	PI3K H1047K, K-ras G13D	rapamicina	0,01	2,5	0,75	++
85	KM12	Colon	PTEN neg	rapamicina	0,01	3,46	0,28	+++
86	LoVo	Colon	K-ras G13D	rapamicina	0,01	2,44	0,42	+++
87	MDST8	Colon	B-raf V600E	rapamicina	0,01	2,44	0,2	+++
88	WiDR	Colon		rapamicina	0,01	0,27	0,2	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
89	ECC-1	Endometrio	PTEN neg	5-FU	2	1,4	0,64	++
90	ECC-1	Endometrio	PTEN neg	docetaxel	0,0009	1,4	0,64	+
91	ECC-1	Endometrio	PTEN neg	gemcitabina	0,0113	1,4	0,83	+
92	HEC-1-A	Endometrio		5-FU	2,5	0,9	0,8	+
93	HEC-1-A	Endometrio		docetaxel	0,0012	0,9	0,56	+++
94	HEC-1-A	Endometrio		gemcitabina	0,05	0,9	0,82	+
95	SK-UT-18	Endometrio	PTEN neg	5-FU	1,3	0,3	0,54	+++
96	SK-UT-18	Endometrio	PTEN neg	docetaxel	0,0005	0,3	0,52	+++
97	SK-UT-18	Endometrio	PTEN neg	gemcitabina	0,0019	0,3	0,79	+
98	U87	Glioma	PTEN neg	temozolomida	11,7	0,27	0,004	+++++
99	G111	Glioma		temozolomida	12	0,42	0,62	++
100	G402	Glioma		5-FU			0,8	
101	G402	Glioma		docetaxel			0,49	
102	G402	Glioma		gemcitabina			0,62	
103	G140	Glioma	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,41	0,22	++++
104	G140	Glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,41	0,83	+
105	G59	Glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,24	0,76	++
106	G61	Glioma		rapamicina	0,01	1,28	0,14	++++
107	G63	Glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,31	1,65	-
108	LN229	Glioma	PI3K E545K	rapamicina	0,01	4,95	0,18	++++
109	LN229	Glioma	PI3K E545K	temozolomida	> 16,25	2,5	1,1	-
110	U87	Glioma	PTEN neg	temozolomida	11,7	0,27	0,48	+++
111	U87	Glioma	PTEN neg	rapamicina	0,01	0,19	0,31	+++
112	H2 122	Pulmón	K-ras G12C, p53	carboplatino	> 10	1,1	0,53	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
113	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	cisplatino	0,5	1,38	0,316	+++
114	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	cisplatino	1	0,815	0,403	+++
115	H2122	pulmón	K-ras G 12C	cisplatino	5	0,38	0,085	+++++
116	H1651	pulmón		cisplatino	0,75	7,71	1,142	-
117	H2122	pulmón	K-ras G 12C, p53 mut	docetaxel	0,0015	0,538	0,58	+++
118	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	paclitaxel	0,0075	1,38	0,084	+++++
119	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	paclitaxel	0,005	0,815	0,064	+++++
120	H2122	pulmón	K-ras G 12C, p53 mut	paclitaxel	0,0015	1,1	0,77	++
121	H1651	pulmón		paclitaxel	0,0015	7,71	1,08	+/-
122	H2122	pulmón	K-ras G 12C, p53 mut	gemcitabina	0,0036	1,1	0,87	+
123	A549	pulmón	K-ras G 12S	gemcitabina	0,01	0,49	0,749	++
124	H1703	pulmón	p53 mut	PD-0325901	> 2	0,675	0,501	+++
125	A549	pulmón	K-ras G 12S	PD-0325901	0,06	0,485	0,076	+++++
126	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	PD-0325901	0,03	1,38	0,124	+++++
127	LKR 10 (ratón)	pulmón	K-ras G 12C	PD-0325901	0,02	0,815	0,156	+++++
128	H322T	pulmón	EGFR	PD-0325901	0,05	1,46	0,088	+++++
129	Calu-6	pulmón	K-ras Q61K	PD-0325901	0,053	3,64	0,061	+++++
130	H2126	pulmón		PD-0325901	1,5	0,467	1,07	+/-
131	H2122	pulmón	K-ras G12C, p53 mut	PD-0325901	0,002	0,538	0,036	+++++
132	H1781	pulmón	p53 mut	PD-0325901	> 2	0,2	0,372	+++
133	H1435	pulmón	p53 mut	PD-0325901	> 2	1,25	0,341	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Indice de combinación (CI)	Sinergia
134	H661	pulmón	p53 mut	PD-0325901	> 2	1,43	1,213	-
135	H1299	pulmón	p53 mut	PD-0325901	2,5	0,414	0,024	+++++
136	A549	pulmón	K-ras G12S	PD-0325901	0,06	0,49	0,076	+++++
137	H23	pulmón	K-ras G12C	PD-0325901	0,01	0,82	0,154	+++++
138	H838	pulmón	EGFR	PD-0325901	> 2	0,578	0,949	+/-
139	LKR13 (ratón)	pulmón	K-ras, p53 mut	PD-0325901	> 2	0,578	0,949	+/-
140	LKR10 (ratón)	pulmón	K-ras, p53 mut	erlotinib	6	1,38	0,042	+++++
141	LKR13 (ratón)	pulmón	K-ras, p53 mut	erlotinib	> 10	0,815	0,109	++++
142	Calu-6	pulmón	K-ras Q61K	erlotinib	7	3,64	0,056	+++++
143	H1299	pulmón	K-ras Q61K	erlotinib	> 10	0,414	0,058	+++++
144	H2126	pulmón	p53 mut	erlotinib	9	0,467	0,293	+++++
145	H661	pulmón	p53 mut	erlotinib	7	1,43	0,532	+++
146	H1435	pulmón	p53 mut	erlotinib	2,5	1,25	0,034	+++++
147	H2122	pulmón	K-ras G12C, p53 mut	erlotinib	6	0,538	0,095	+++++
148	H1781	pulmón	p53 mut	erlotinib	> 10	0,2	0,383	++++
149	A549	pulmón	K-ras G12S	erlotinib	13,1	0,49	0,167	++++
150	H1703	pulmón	p53 mut	erlotinib	6	0,675	0,781	++
151	H1781	pulmón	p53 mut	erlotinib	> 10	0,2	0,383	++++
152	H838	pulmón	EGFR	erlotinib	6	0,578	0,808	+
153	H23	pulmón	K-ras G12C	erlotinib	> 20	0,81	0,282	++++
154	H322T	pulmón	EGFR	erlotinib	0,16	1,46	0,29	++++
155	H1651	pulmón		erlotinib	> 10	7,71	0,739	++
156	H838	pulmón	EGFR	erlotinib	6	0,578	0,808	++
157	A427	pulmón	K-ras G12D	erlotinib	> 10	0,458	0,038	+++++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
158	H1155	pulmón	K-ras Q61H	erlotinib	8,62	1,456	0,415	+++
159	H1299	pulmón	p53 mut	erlotinib	> 10	0,41	0,2	++++
160	H1975	pulmón		erlotinib	5,51	0,836	0,811	+
161	H2009	pulmón	K-ras Q61H	erlotinib	7,1	0,595	0,446	+++
162	H2030	pulmón	K-ras Q61C	erlotinib	5,82	1,874	0,41	+++
163	H292	pulmón	K-ras N85K	erlotinib	2,1	0,391	0,446	+++
164	H358	pulmón	K-ras G12C	erlotinib	0,66	2,474	0,273	++++
165	H441	pulmón	K-ras G12V	erlotinib	4,89	4,195	0,27	++++
166	H460	pulmón	K-ras G61H	erlotinib	> 10	0,24	0,314	+++
167	H647	pulmón	K-ras G13D	erlotinib	> 2	1,43	1,213	-
168	H650	pulmón	K-ras Q61L	erlotinib	> 10	14,34	0,245	++++
169	537MEL	melanoma	PTEN neg	5-FU	> 50	0,49	0,65	++
170	537MEL	melanoma	PTEN neg	docetaxel	0,0125	0,49	0,29	++++
171	537MEL	melanoma	PTEN neg	gemcitabina	0,0045	0,49	0,85	+
172	A375	melanoma	B-raf V600E	temozolomida	> 10	2,06	0,007	+++++
173	Malme-3M	melanoma		temozolomida	> 20	0,35	0,18	++++
174	537MEL	melanoma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,49	1,2	-
175	537Mel	melanoma	PTEN neg	PD-0325901	0,009	0,49	0,16	++++
176	A375	melanoma	B-raf V600E	PD-0325901	0,004	2,06	0,19	++++
177	Hs294T	melanoma		PD-0325901	0,022	0,50	0,2	++++
178	Malme-3M	melanoma		PD-0325901	0,35	0,004	0,6	+++
179	MeWo	melanoma		PD-0325901	0,14	0,67	0,06	+++++
180	A2058	melanoma		PD-0325901	0,04	0,45	0,29	++++
181	C32	melanoma		PD-0325901	0,02	0,51	0,66	+++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
182	LOX	melanoma		PD-0325901	0,22	0,91	0,001	+++++
183	RPMI-7951	melanoma		PD-0325901	0,01	0,32	0,60	+++
184	SK-MEL-28	melanoma		PD-0325901	0,009	0,57	0,34	+++
185	624 Mel	melanoma		HPPD	0,17	0,66	0,44	+++
186	888Mel	melanoma		HPPD	0,48	0,73	0,31	+++
187	928 Mel	melanoma		HPPD	0,45	0,58	0,61	+++
188	537 Mel	melanoma	PTEN neg	HPPD	0,26	0,49	0,39	+++
189	A2058	melanoma	B-raf V600E, PTEN neg	HPPD	20,0	0,45	0,44	+++
190	A375	melanoma	B-raf V600E	HPPD	0,16	2,06	0,73	++
191	C32	melanoma		HPPD	0,36	0,51	0,56	+++
192	Colo829	melanoma		HPPD	1,52	1,11	0,30	+++
193	G361	melanoma		HPPD	0,54	0,54	0,53	+++
194	Hs 294T	melanoma		HPPD	2,20	0,50	0,80	++
195	Hs 695T	melanoma		HPPD	1,80	0,24	0,83	++
196	LOX	melanoma		HPPD	20,0	0,91	0,13	+++++
197	Malme-3M	melanoma		HPPD	0,28	0,35	0,49	+++
198	MeWo	melanoma		HPPD	20,0	0,67	2,39	----
199	RPMI-7951	melanoma		HPPD	2,40	0,32	0,63	+++
200	SK23	melanoma		HPPD	1,12	0,49	1,13	-
201	SK-MEK-28	melanoma		HPPD	0,22	0,57	0,60	+++
202	TOV21G	ovario	K-ras G13C	5-FU	1	0,48	1,019	+/-
203	FU-OV1	ovario		5-FU	10	0,146	0,896	+
204	TOV112D	ovario		5-FU	5	0,294	0,899	+

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Indice de combinación (CI)	Sinergia
205	EFO21	ovario		5-FU	5	0,77	0,967	+/-
206	SKOV3	ovario		5-FU	> 40	0,66	1,94	--
207	OVCAR3	ovario		5-FU	5	0,34	0,915	+/-
208	TOV112D	ovario		carboplatino	30,7	1,53	1,06	+/-
209	TOV21G	ovario	K-ras G13C	carboplatino	11	1,03	0,487	+++
210	FU-OV1	ovario		docetaxel	> 0,02	0,146	0,733	++
211	TOV112D	ovario		docetaxel	0,0002	1,53	0,969	+/-
212	TOV112D	ovario		docetaxel	0,02	0,294	1,06	+/-
213	SKOV3	ovario		docetaxel	0,01	0,68	0,177	++++
214	OVCAR3	ovario		docetaxel	0,001	0,34	0,709	++
215	EFO21	ovario		docetaxel	0,01	0,77	0,937	+/-
216	TOV21G	ovario	K-ras G13C	docetaxel	0,005	0,48	0,962	+/-
217	EFO21	ovario		doxorubicina	0,02	0,77	0,921	+/-
218	SKOV3	ovario		doxorubicina	0,3	0,66	0,39	+++
219	FU-OV1	ovario		gemcitabina	> 0,02	0,146	0,686	+++
220	EFO21	ovario		gemcitabina	0,01	0,77	0,579	+++
221	SKOV3	ovario		gemcitabina	0,0018	0,66	1,177	-
222	OVCAR3	ovario		gemcitabina	0,001	0,34	1,022	+/-
223	TOV21G	ovario	K-ras G13C	gemcitabina	0,0005	0,48	0,536	+++
224	EFO21	ovario		PD-0325901	0,01	0,77	0,196	++++
225	OVCAR3	ovario		PD-0325901	> 2	0,34	0,912	+/-
226	SKOV3	ovario		PD-0325901	> 2	0,66	0,144	++++
227	OVCAR3	ovario		tamoxifeno	> 20	0,34	0,875	+
228	SKOV3	ovario		tamoxifeno	> 20	0,66	0,821	++

Figura 1-A

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación de gen	Ag. quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto la	Índice de combinación (CI)	Sinergia
229	ASPC-1	Pancreático	Kras G12D	gemcitabina	0,021	3,36	0,236	+++
230	MiaCaPa1	Pancreático	Kras G12D	erlotinib	> 10	0,78	1,13	-
231	ASPC-1	Pancreático	Kras G12D	erlotinib	4,28	3,36	0,794	++
232	HPAF-II	Pancreático	Kras G12D	PD-0325901	0,14	1,19	0,07	++++
233	ASPC-1	Pancreático	Kras G12D	PD-0325901	0,02	0,81	0,3	++++
234	SW1990	Pancreático	Kras G12D	PD-0325901	0,03	5,43	0,3	++++
235	BxPC3	Pancreático	Kras G12D	PD-0325901	0,05	0,55	0,4	+++
236	Panc 05.05	Pancreático	Kras G12D	PD-0325901	0,008	0,23	0,5	+++
237	KP4	Pancreático	Kras G12D	HPPD	20,0	1,73	0,86	+
238	PATU8988T	Pancreático	Kras G12D	HPPD	20,0	0,59	1,06	+/-
239	SU86.85	Pancreático	Kras G12D	HPPD	20,0	7,90	0,39	+++
240	PC-3	Próstata		5-FU	5	0,27	0,711	++
241	DU1145	Próstata		docetaxel	8,2	0,865	0,918	+/-
242	PC-3	Próstata		docetaxel	0,0025	0,27	0,364	+++
243	22rv1	Próstata		docetaxel	0,005	0,25	0,511	+++
244	PC-3	Próstata		doxorubicina	0,002	0,27	1,248	--
245	PC-3	Próstata		gemcitabina	0,01	0,27	0,972	+/-
246	DU1145	Próstata		paclitaxel	0,032	0,865	0,79	++
247	22rv1	Próstata		PD-0325901	> 10	0,25	0,308	+++
248	PC-3	Próstata		PD-0325901	0,013	0,27	1,07	+/-

Figura 1-A

Ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ib y varios agentes quimioterapéuticos.

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación ras	Ag. Quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto Ib	Índice de combinación (CI)	Sinergia
1	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	docetaxel	0,0016	0,232	0,32	+++
2	MDA-MB-361	mama	PI3K E545K	gemcitabina	0,148	0,232	0,54	++
3	C-33A	cervical	PTEN neg	5-FU	3,84	1,36	0,9	+
4	ME-180	cervical	PI3K E545K	5-FU	4	0,6	0,87	+
5	SiHa	cervical		5-FU	47	0,62	1,15	-
6	ME-180	cervical	PI3K E545K	docetaxel	0,0017	0,14	0,74	+
7	C-33A	cervical	PTEN neg	docetaxel	0,001	1,36	0,73	+
8	SiHa	cervical		docetaxel	0,0026	0,62	0,93	+
9	SiHa	cervical		gemcitabina	0,0025	0,62	0,47	++
10	ME-180	cervical	PI3K E545K	gemcitabina	0,035	0,6	0,54	++
11	C-33A	cervical	PTEN neg	gemcitabina	0,0025	1,36	0,65	++
12	ECC-1	endometrio	PTEN neg	5-FU	2	0,34	0,66	++
13	ECC-1	endometrio	PTEN neg	docetaxel	0,0009	0,34	0,8	+
14	ECC-1	endometrio	PTEN neg	gemcitabina	0,0113	0,34	0,83	+
15	HEC-1-A	endometrio		5-FU	2,5	0,3	0,94	+
16	HEC-1-A	endometrio		docetaxel	0,0012	0,3	0,77	+
17	HEC-1-A	endometrio		gemcitabina	0,05	0,3	0,7	+
18	SK-UT-1B	endometrio	PTEN neg	5-FU	1,3	0,11	0,87	+
19	SK-UT-1B	endometrio	PTEN neg	docetaxel	0,0005	0,11	0,59	++
20	SK-UT-1B	endometrio	PTEN neg	gemcitabina	0,0019	0,11	0,51	++
21	G402	glioma		5-FU			1,05	-
22	G402	glioma		docetaxel			0,67	++

Figura 1-B

Ensayos de proliferación de células *in vitro* de combinaciones de compuesto de fórmula Ib y varios agentes quimioterapéuticos.

Exp.	Línea de células	Tipo de tumor	Mutación ras	Ag. Quimioterapéutico	EC50 ag. quimio.	EC50 Compuesto Ib	Índice de combinación (CI)	Sinergia
23	G402	glioma		gemcitabina			0,86	+
24	G111	glioma		temozolomida	> 16,25	0,33	0,71	++
25	G140	glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,35	1,03	-
26	G59	glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,47	0,92	+
27	G63	glioma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,6	0,85	+
28	LN229	glioma	PI3K E545K	temozolomida	> 16,25	0,7	0,99	-
29	U87	glioma	PTEN neg	temozolomida	11,7	0,266	0,66	++
30	537MEL	melanoma	PTEN neg	temozolomida	> 16,25	0,32	1,01	-
31	537MEL	melanoma	PTEN neg	5-FU	> 50	0,625	0,67	++
32	537MEL	melanoma	PTEN neg	docetaxel	0,0125	0,625	0,33	+++
33	537MEL	melanoma	PTEN neg	gemcitabina	0,0045	0,625	0,45	+++

Figura 1-B

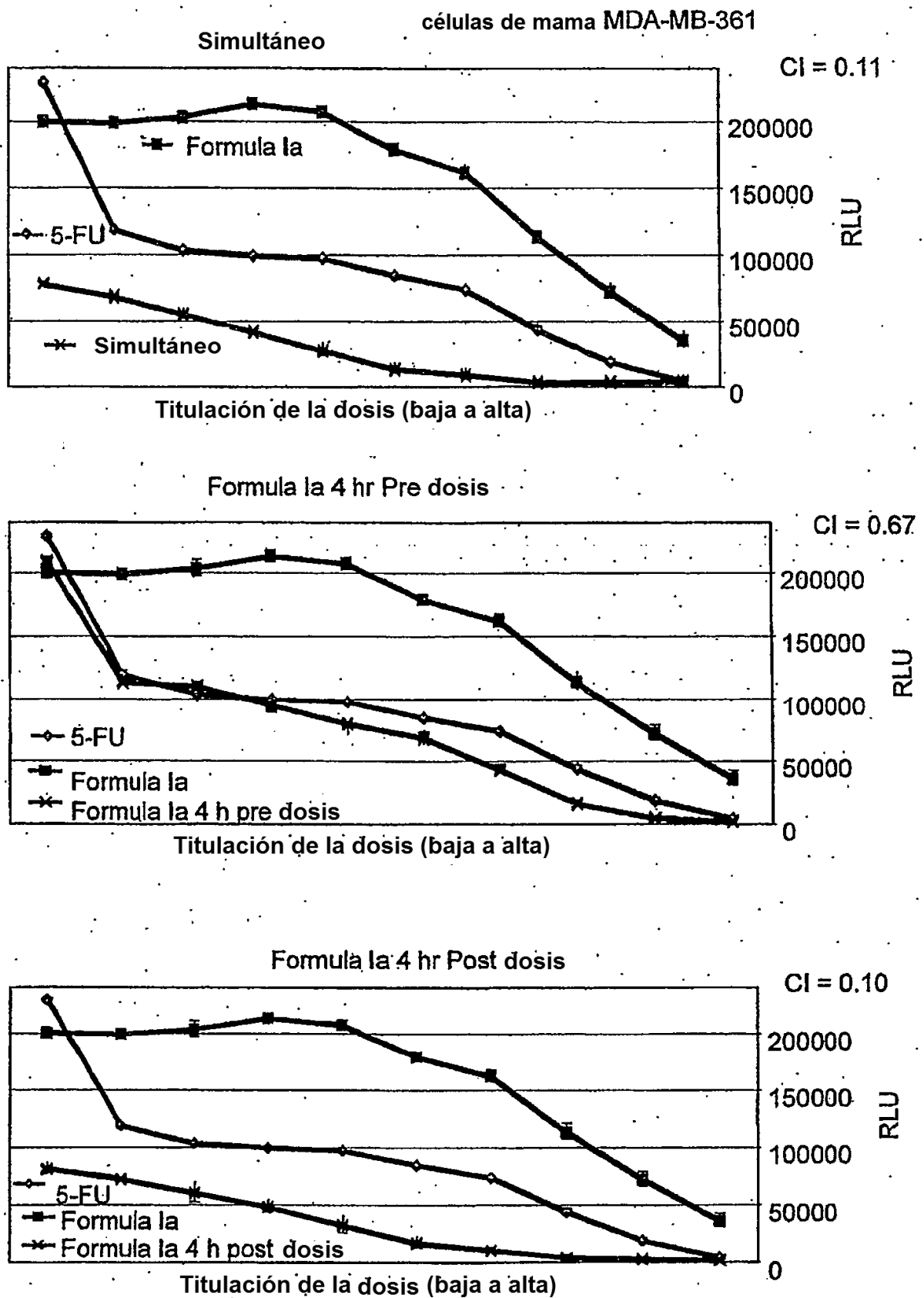


Figura 2

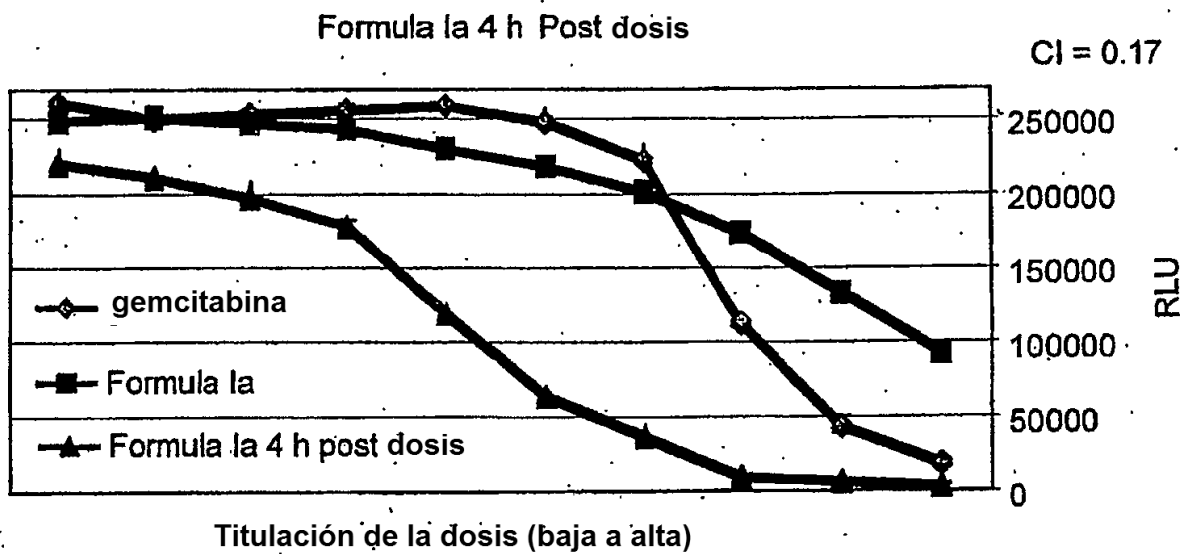
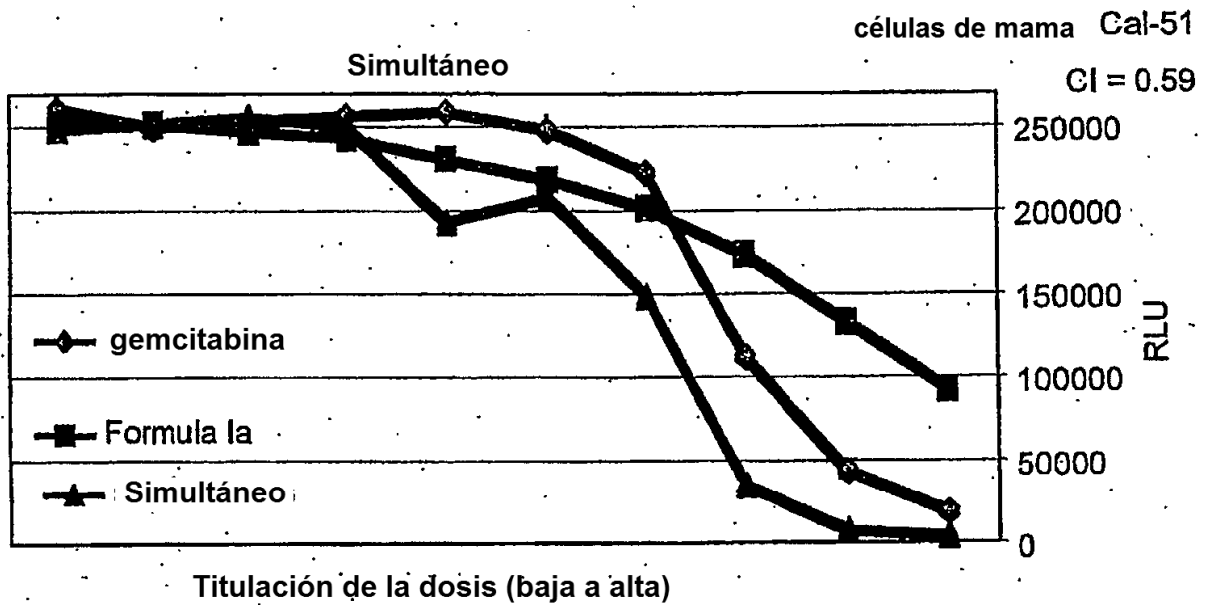


Figura 3

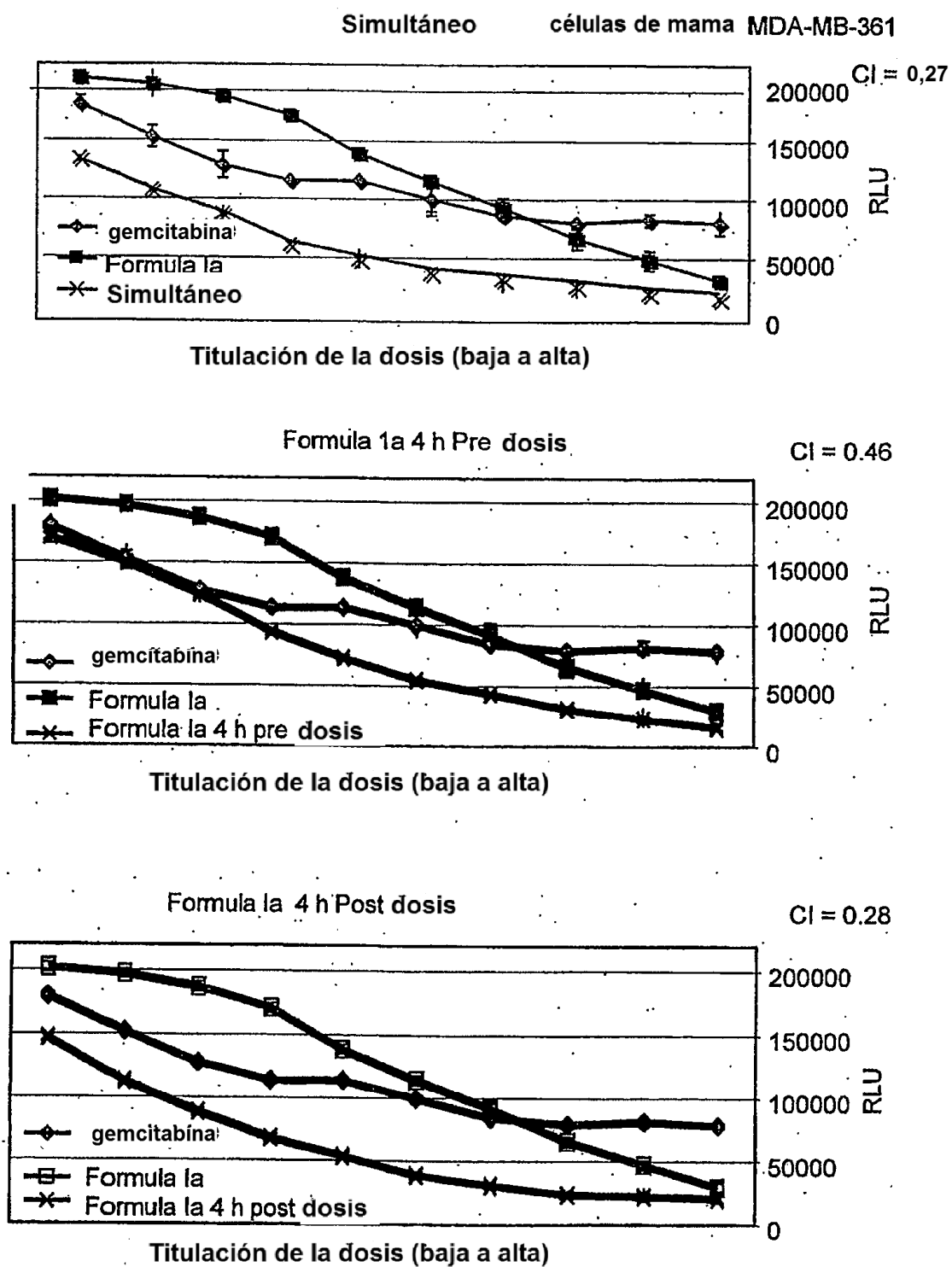


Figura 4

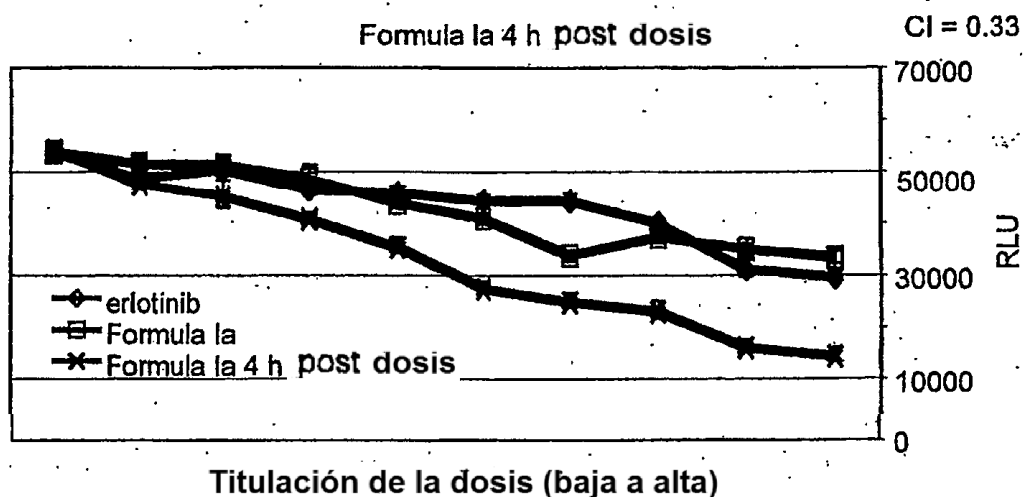
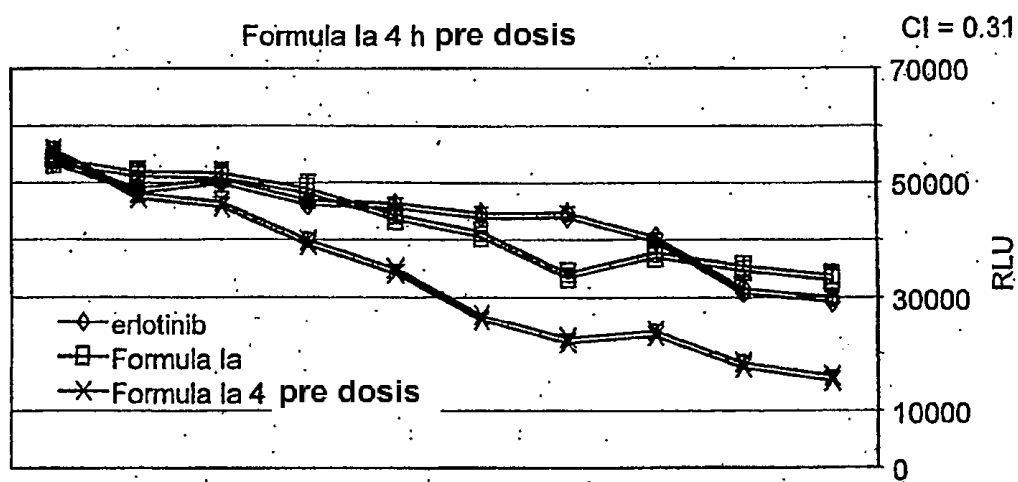
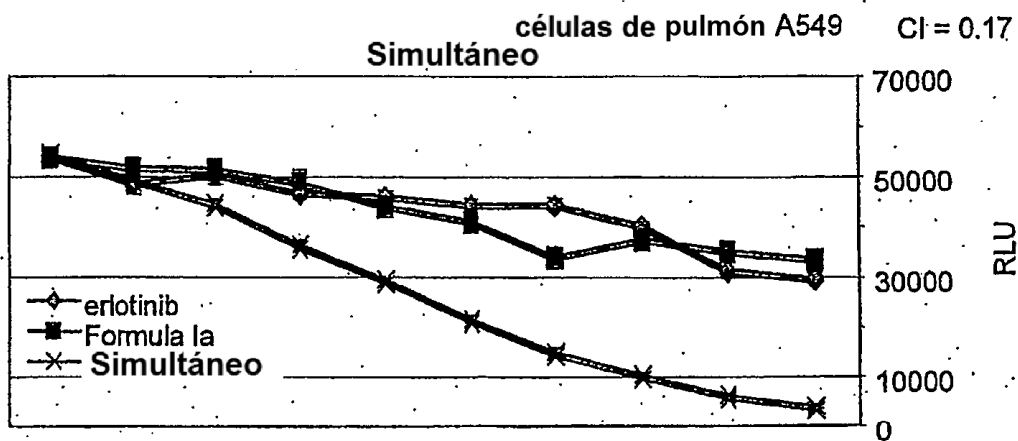


Figura 5

células de pulmón H23

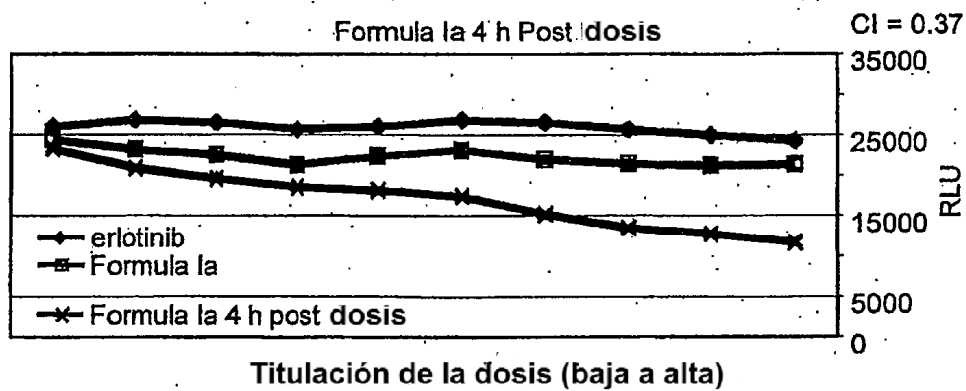
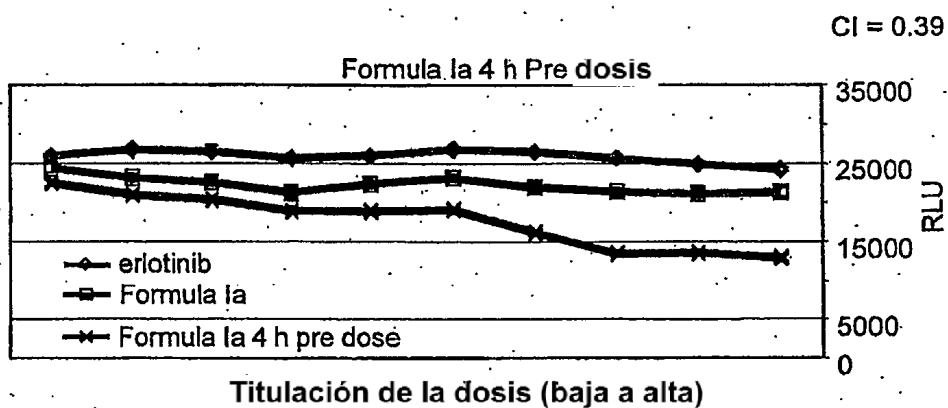
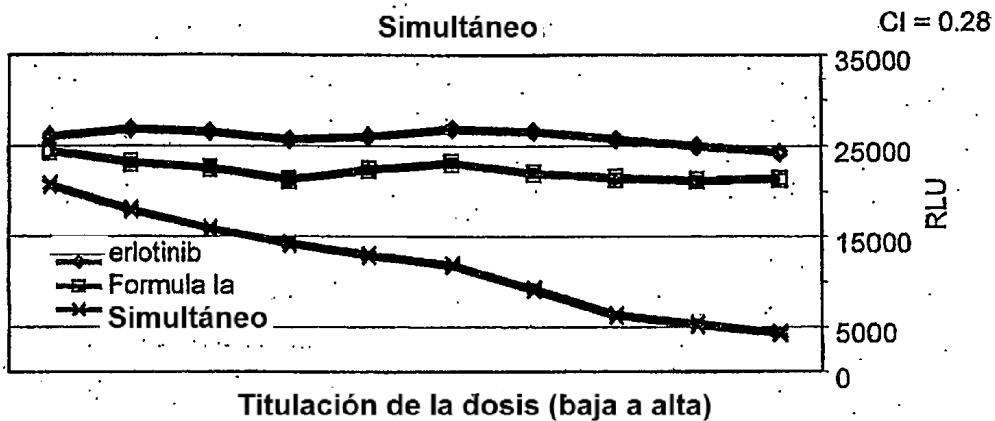


Figura 6

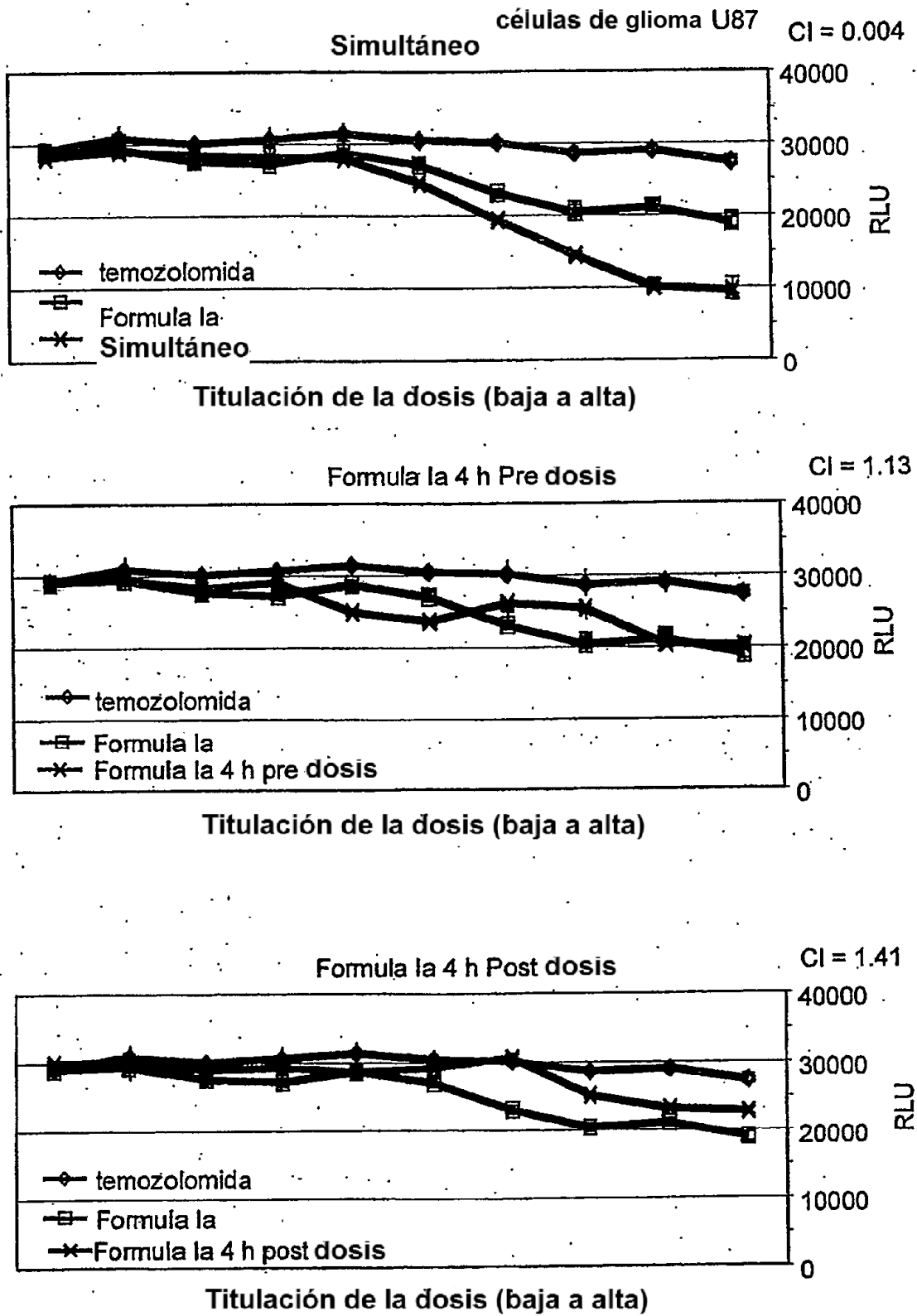


Figura 7

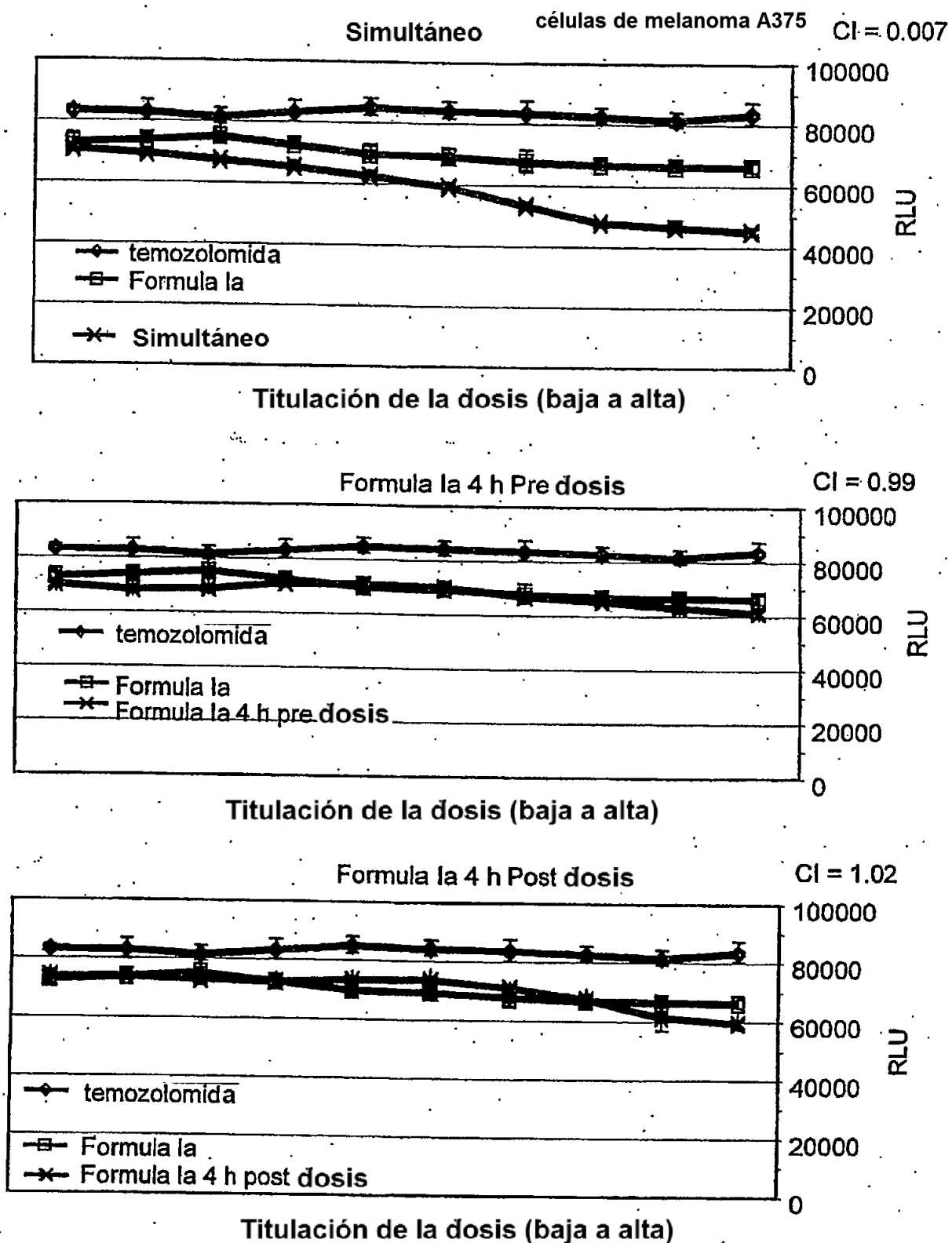


Figura 8

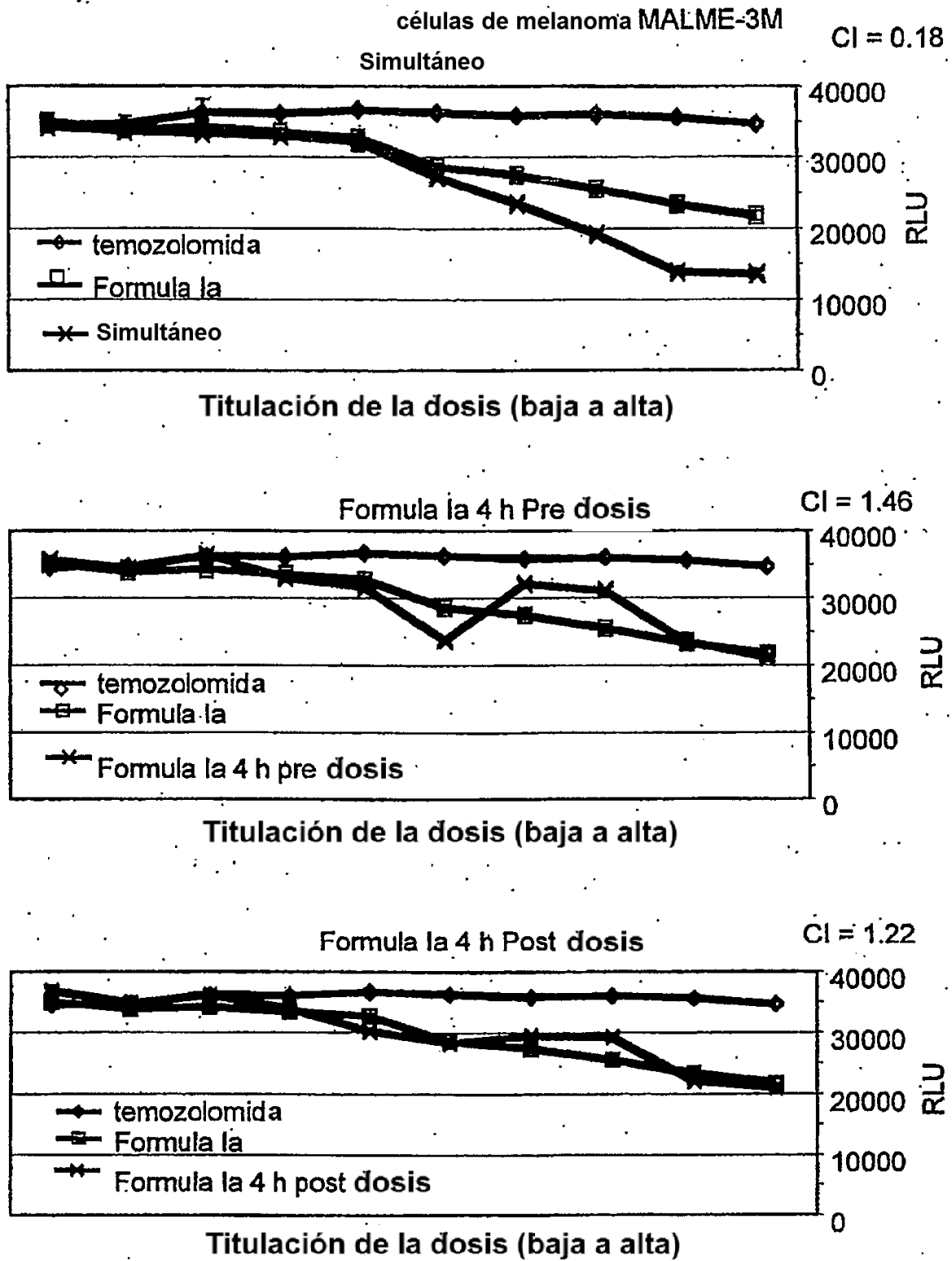
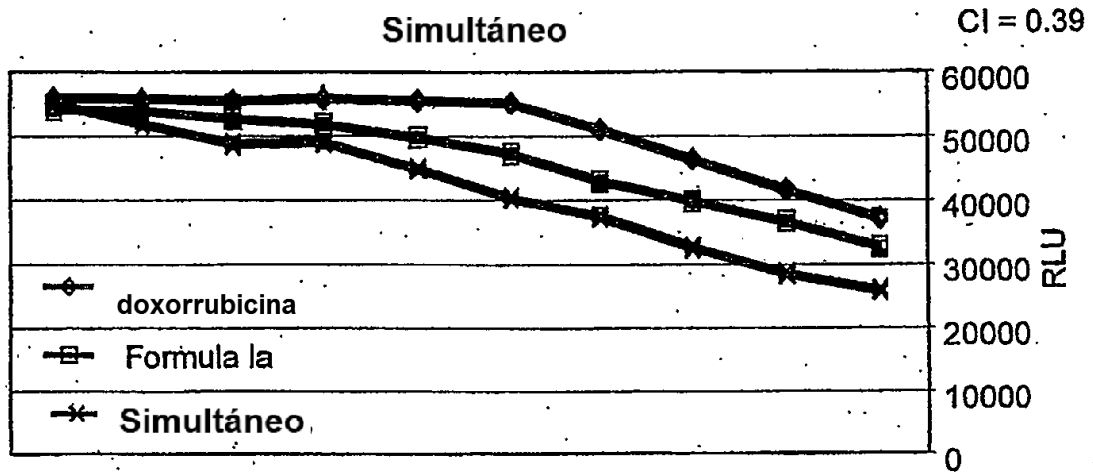
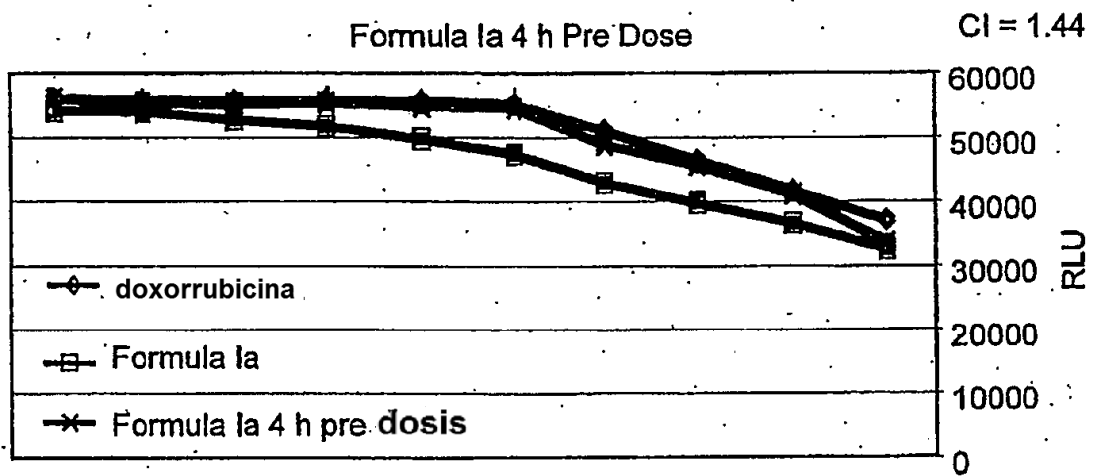


Figura 9

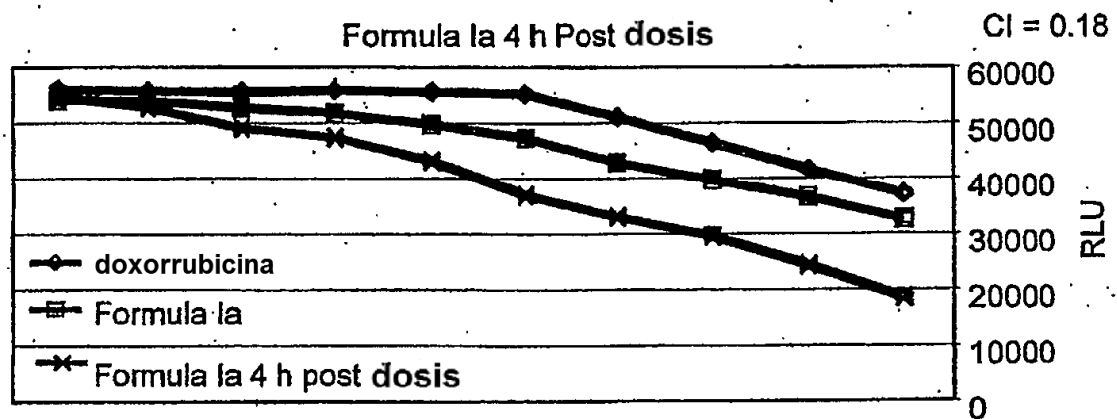
células de ovario SKOV3



Titulación de la dosis (baja a alta)



Titulación de la dosis (baja a alta)



Titulación de la dosis (baja a alta)

Figura 10

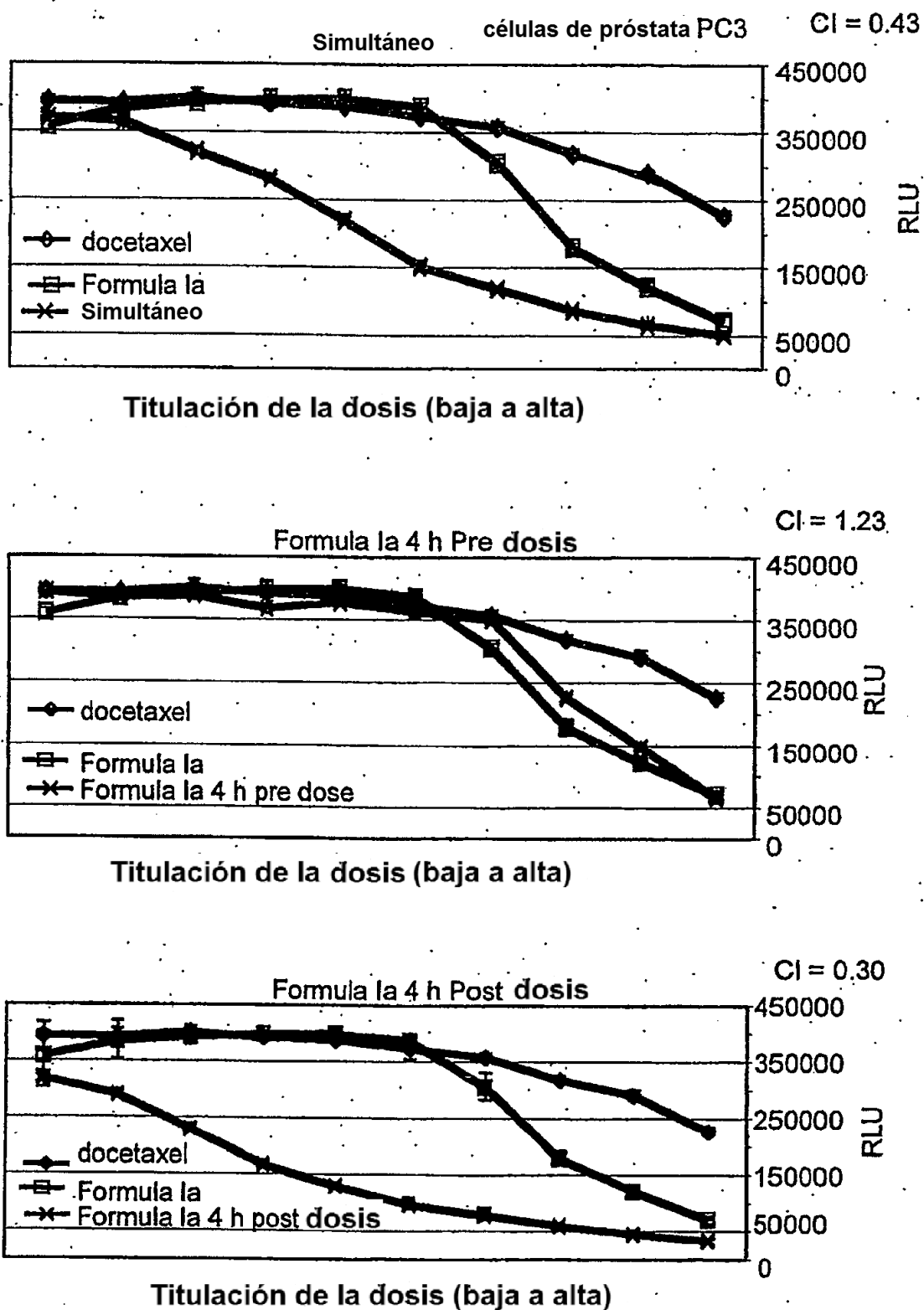


Figura 11

erlotinib + compuesto de fórmula Ia

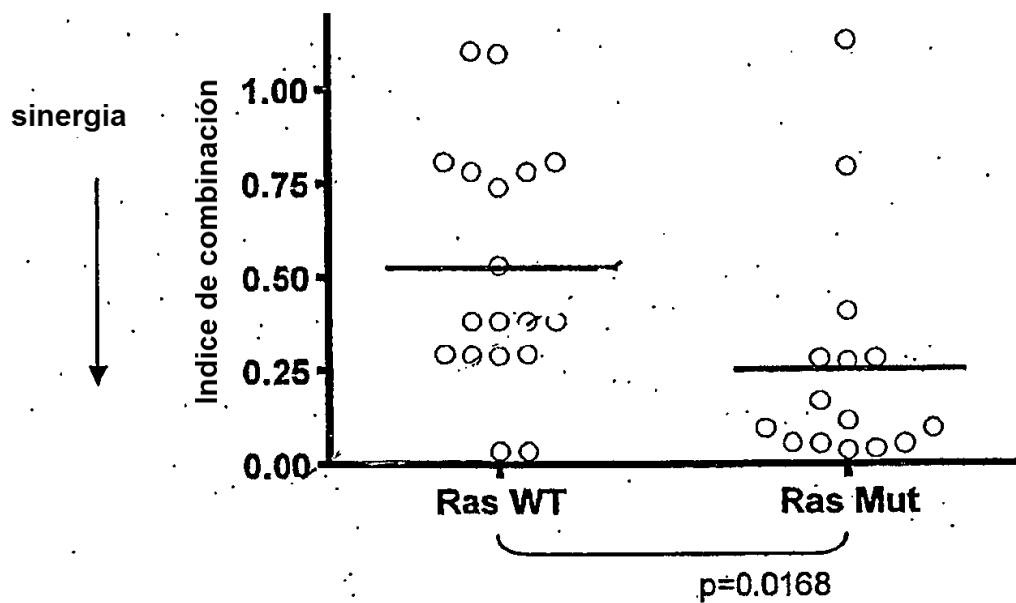


Figura 12

PD0325901 + compuesto de fórmula Ia

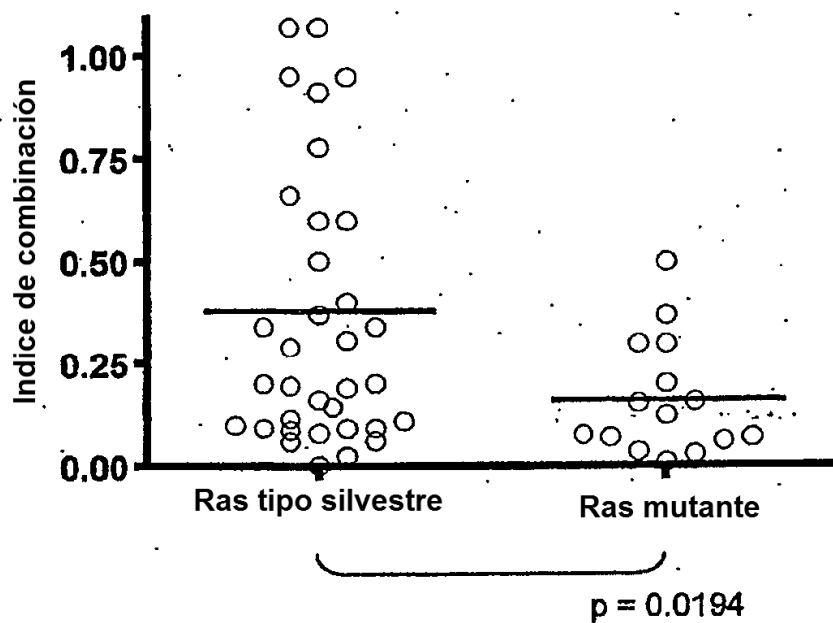


Figura 13

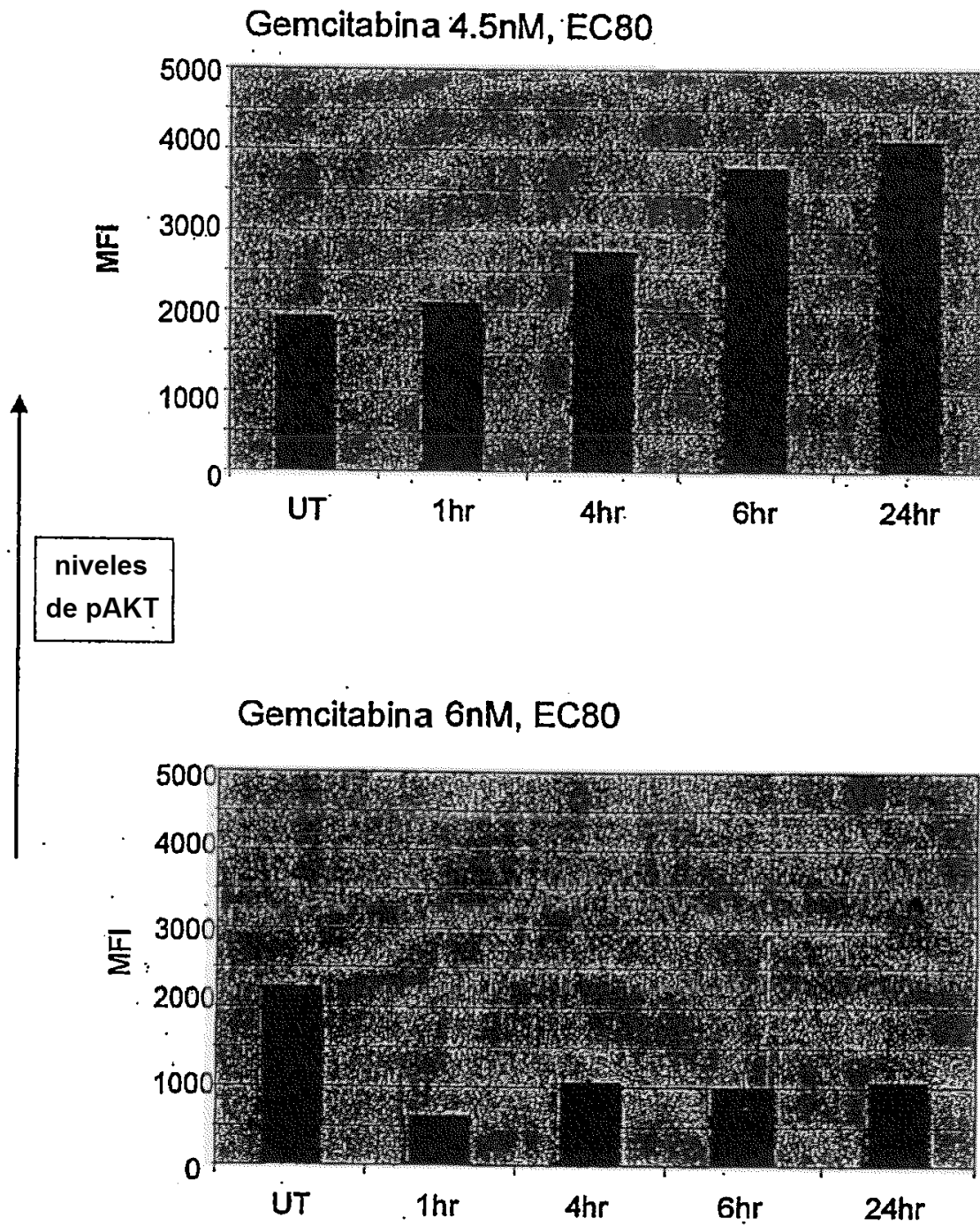


Figura 14

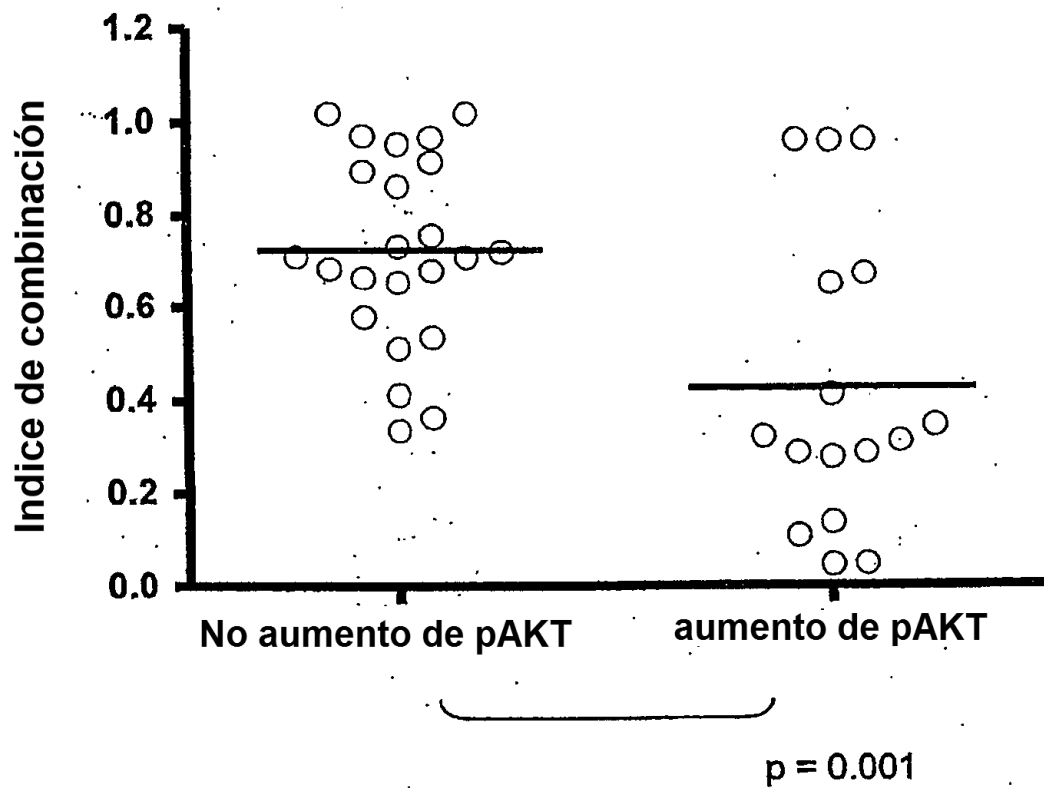


Figura 15

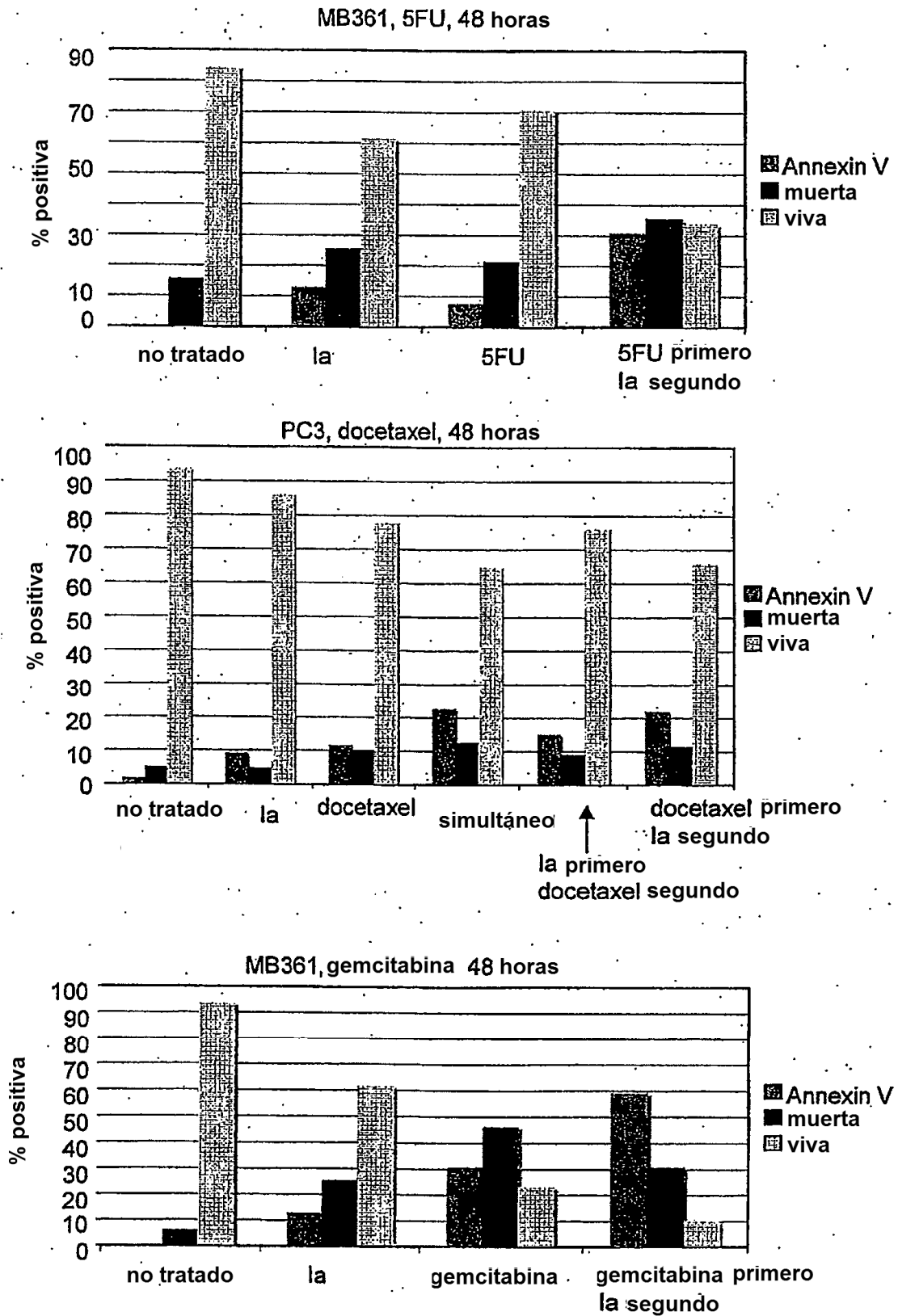


Figura 16

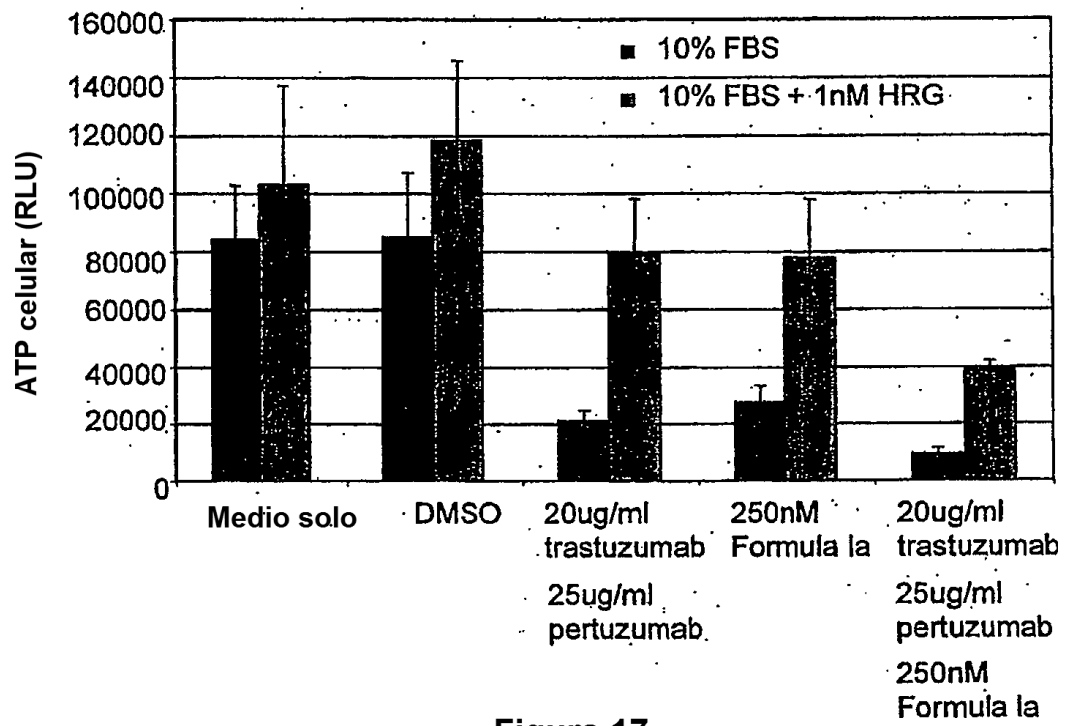


Figura 17

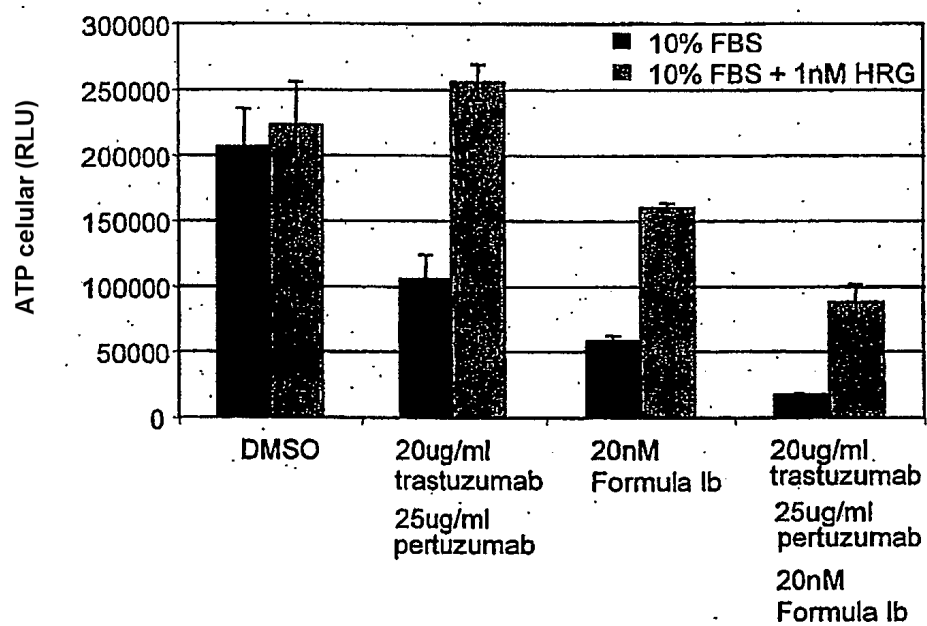


Figura 18

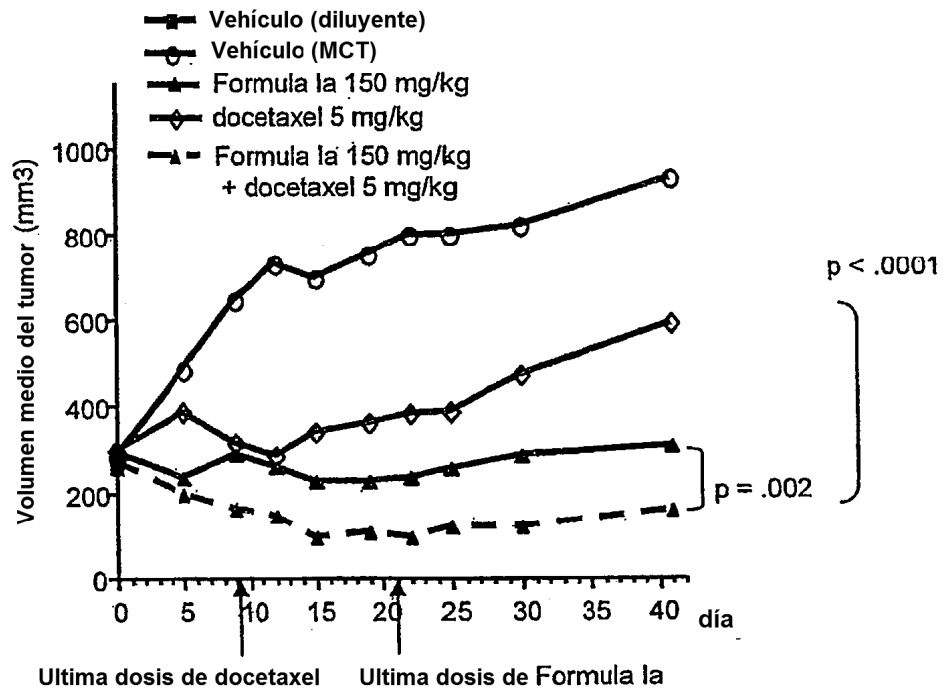


Figura 19

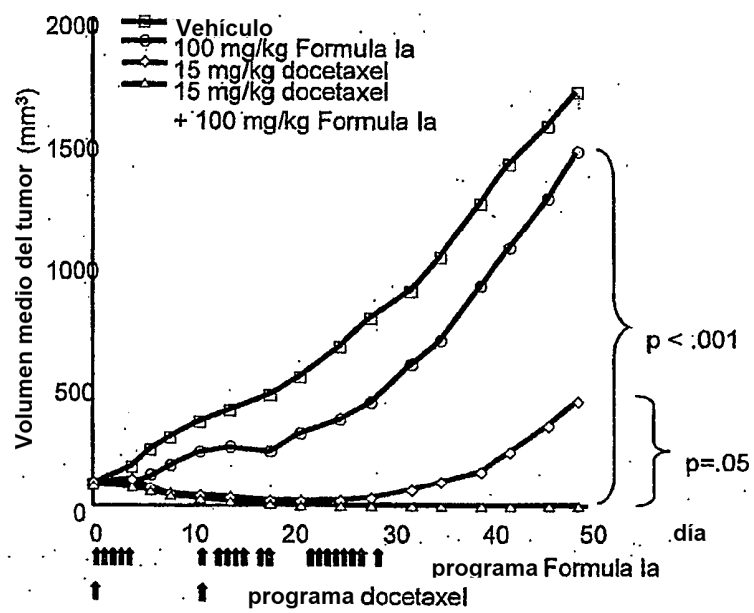


Figura 20

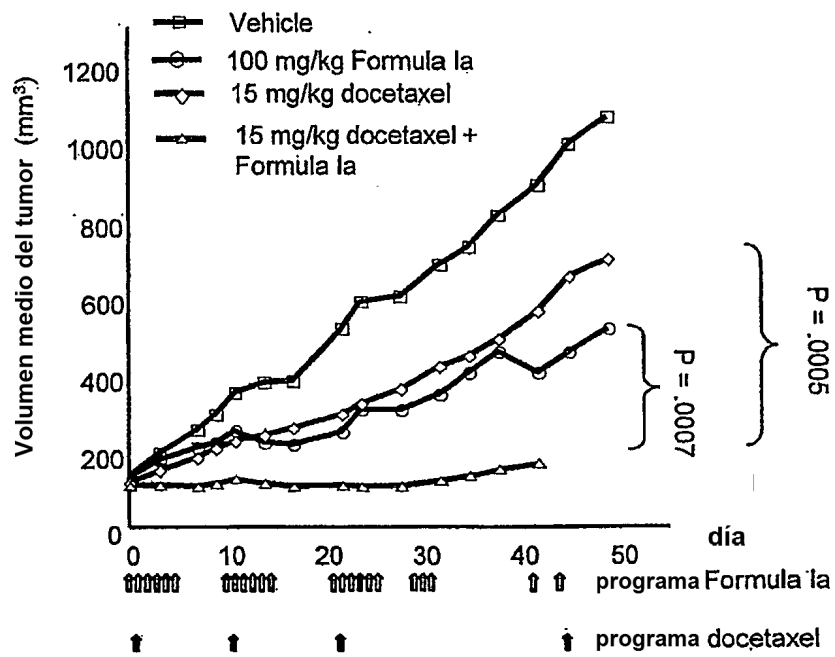


Figura 21

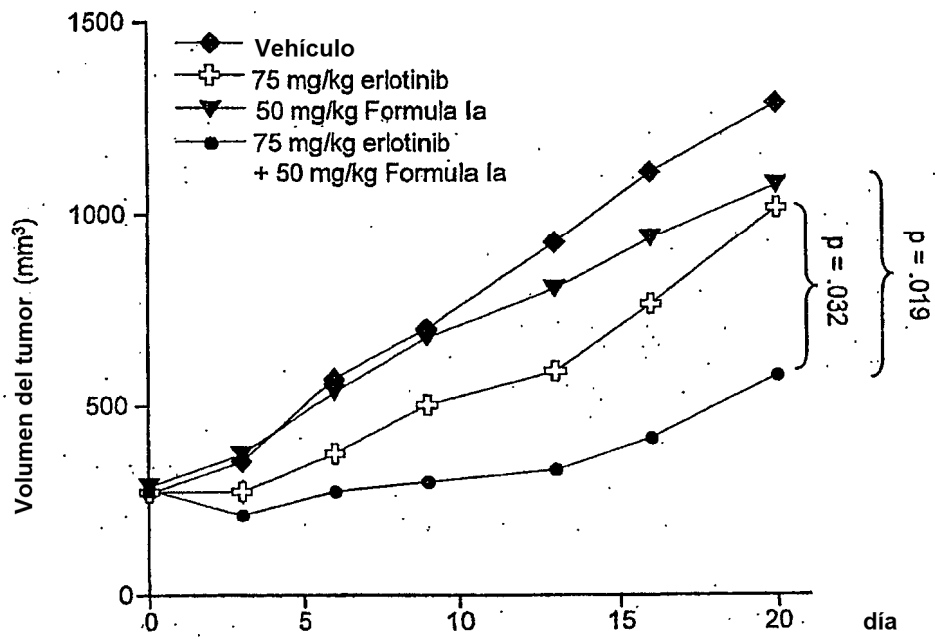


Figura 22

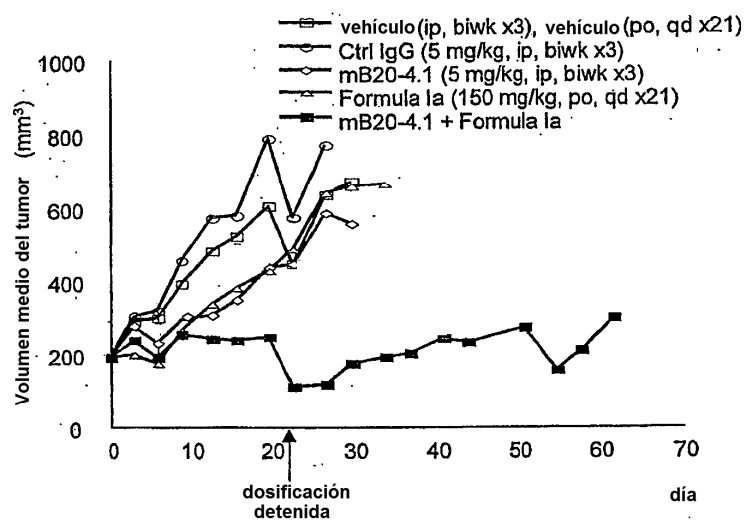


Figura 23

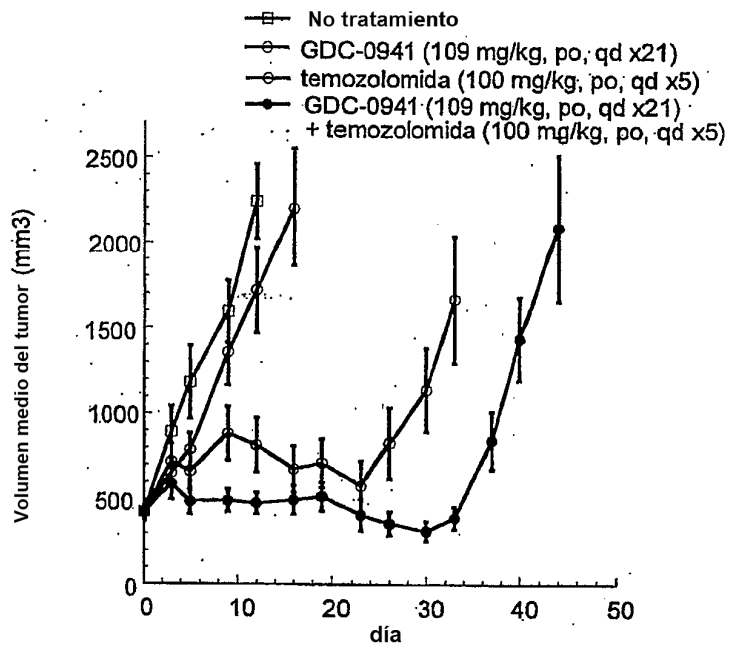


Figura 24

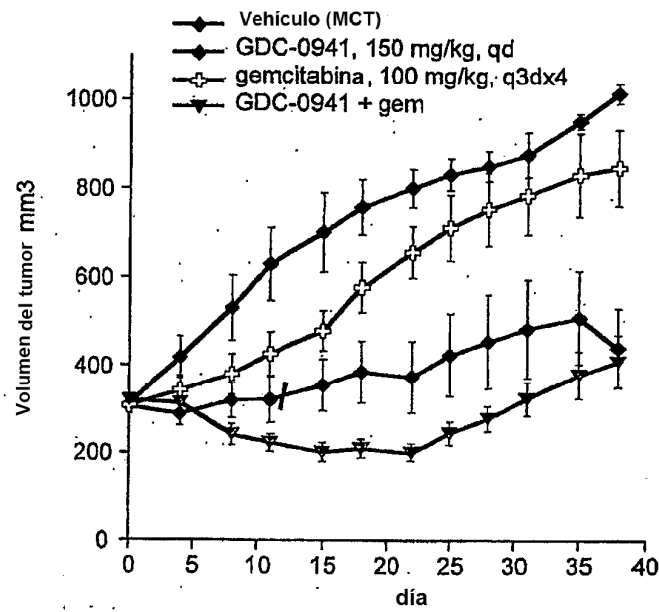


Figura 25

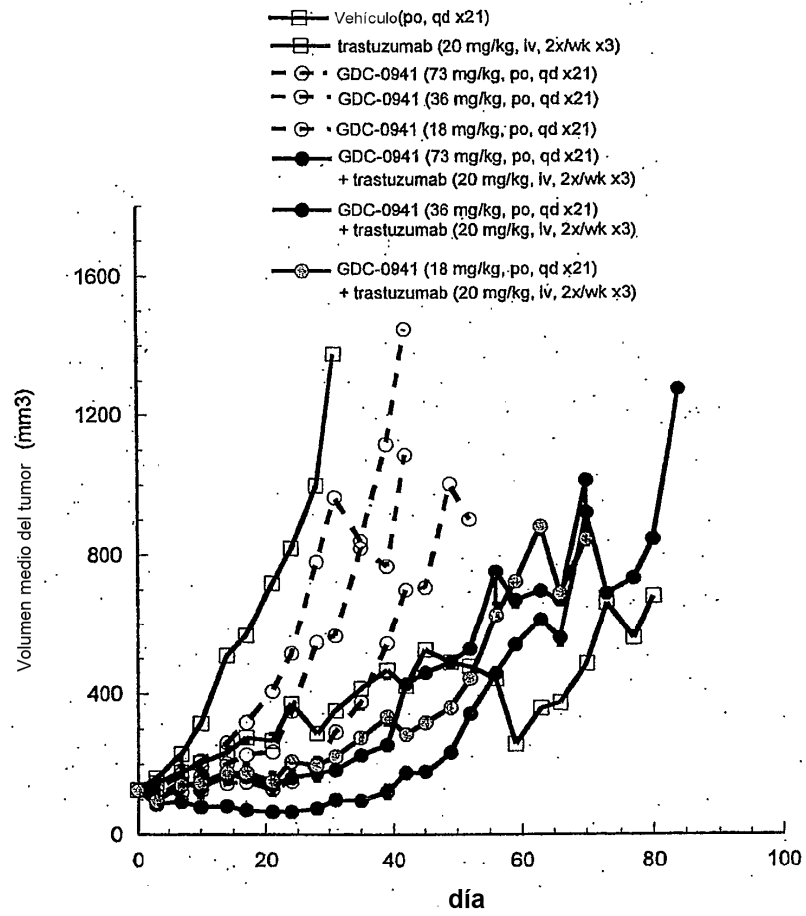


Figura 26

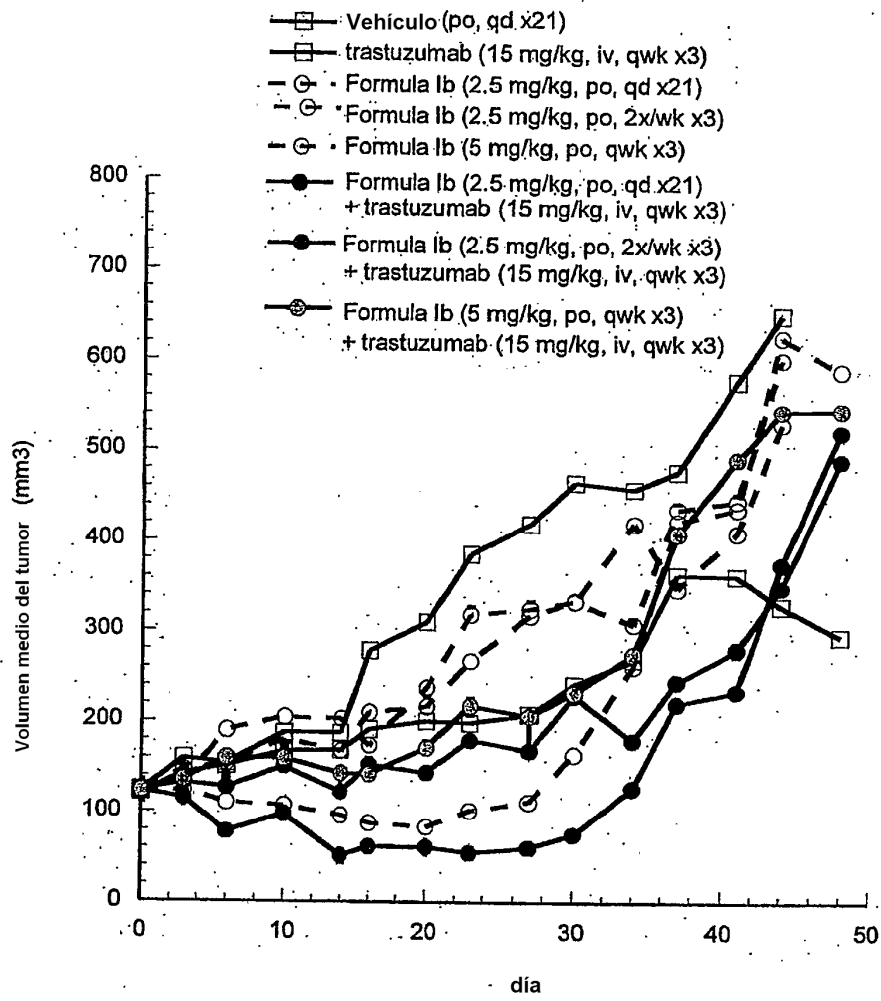


Figura 27

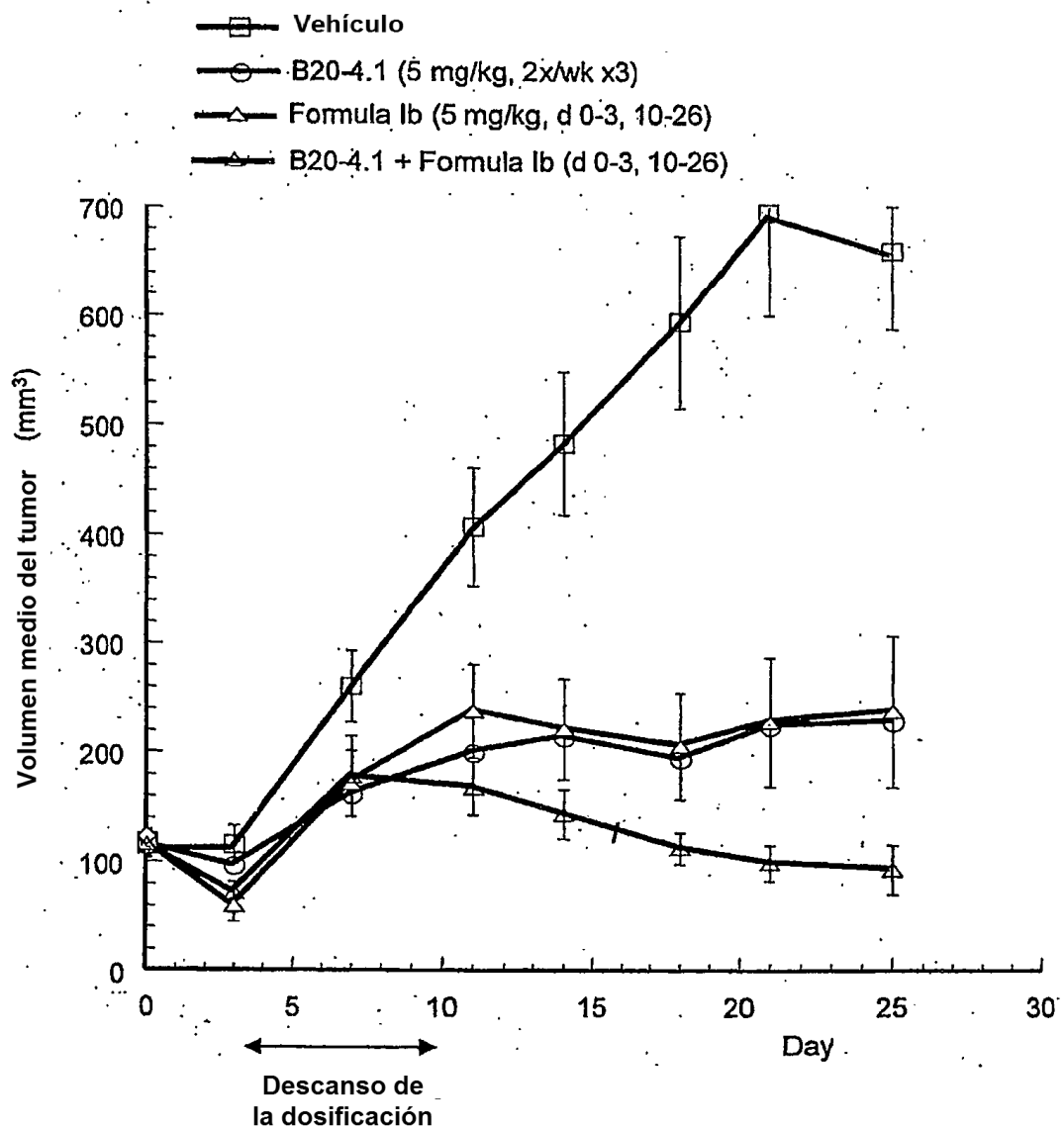


Figura 28

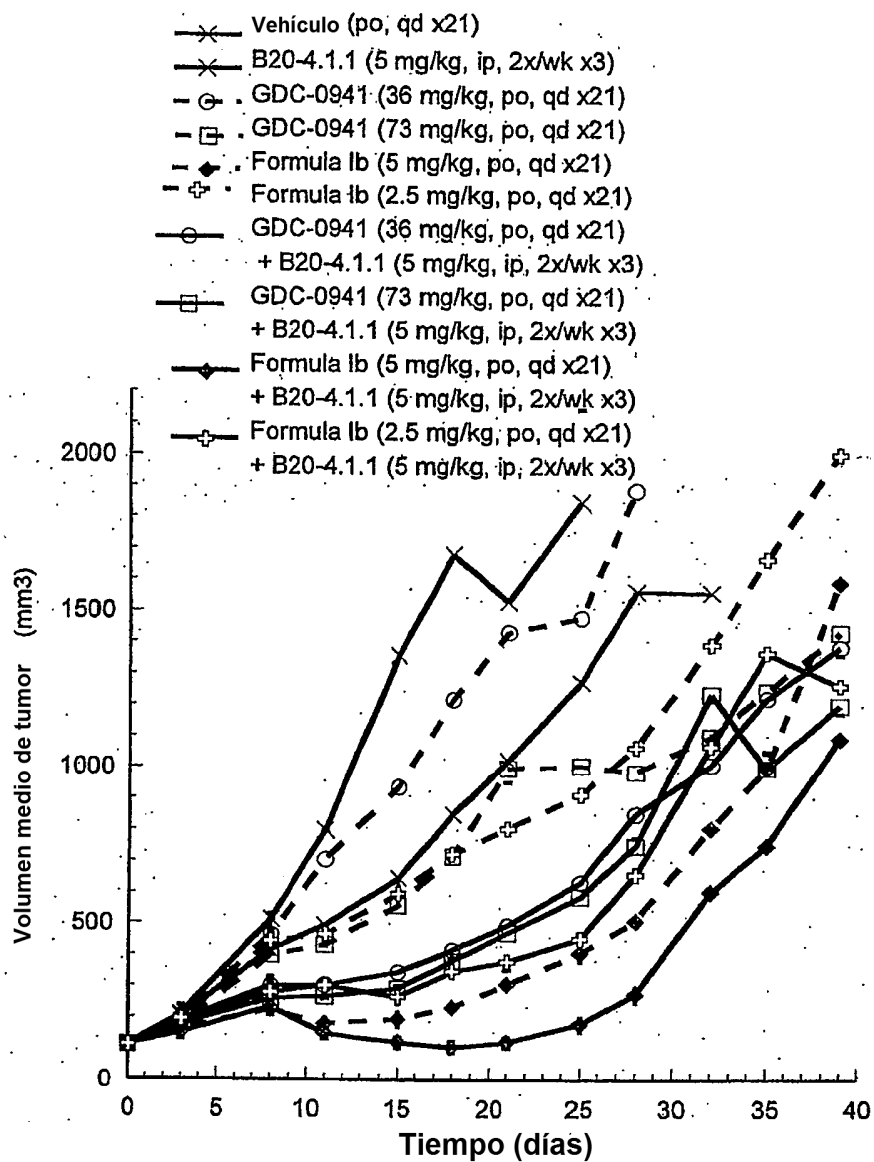


Figura 29

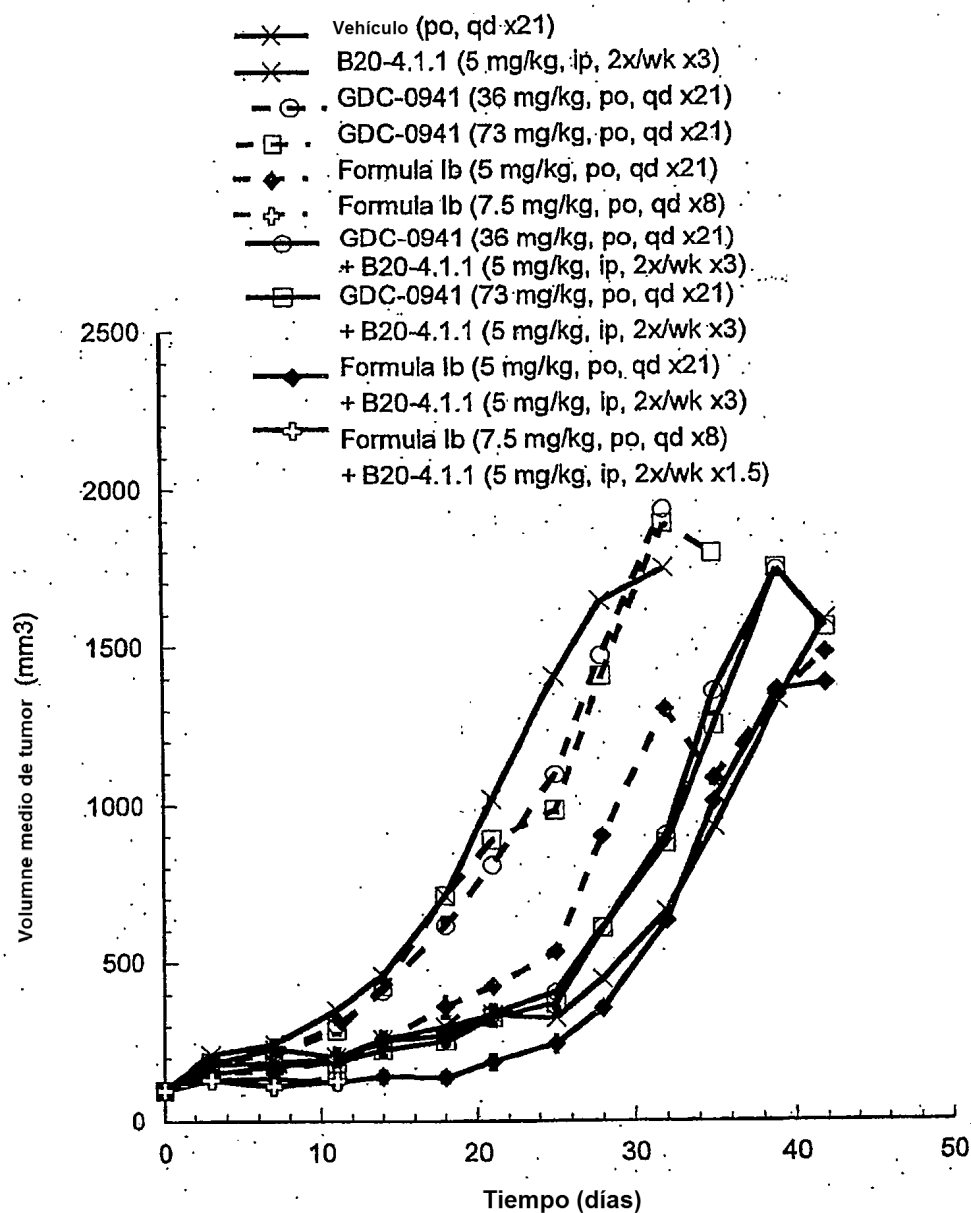


Figura 30

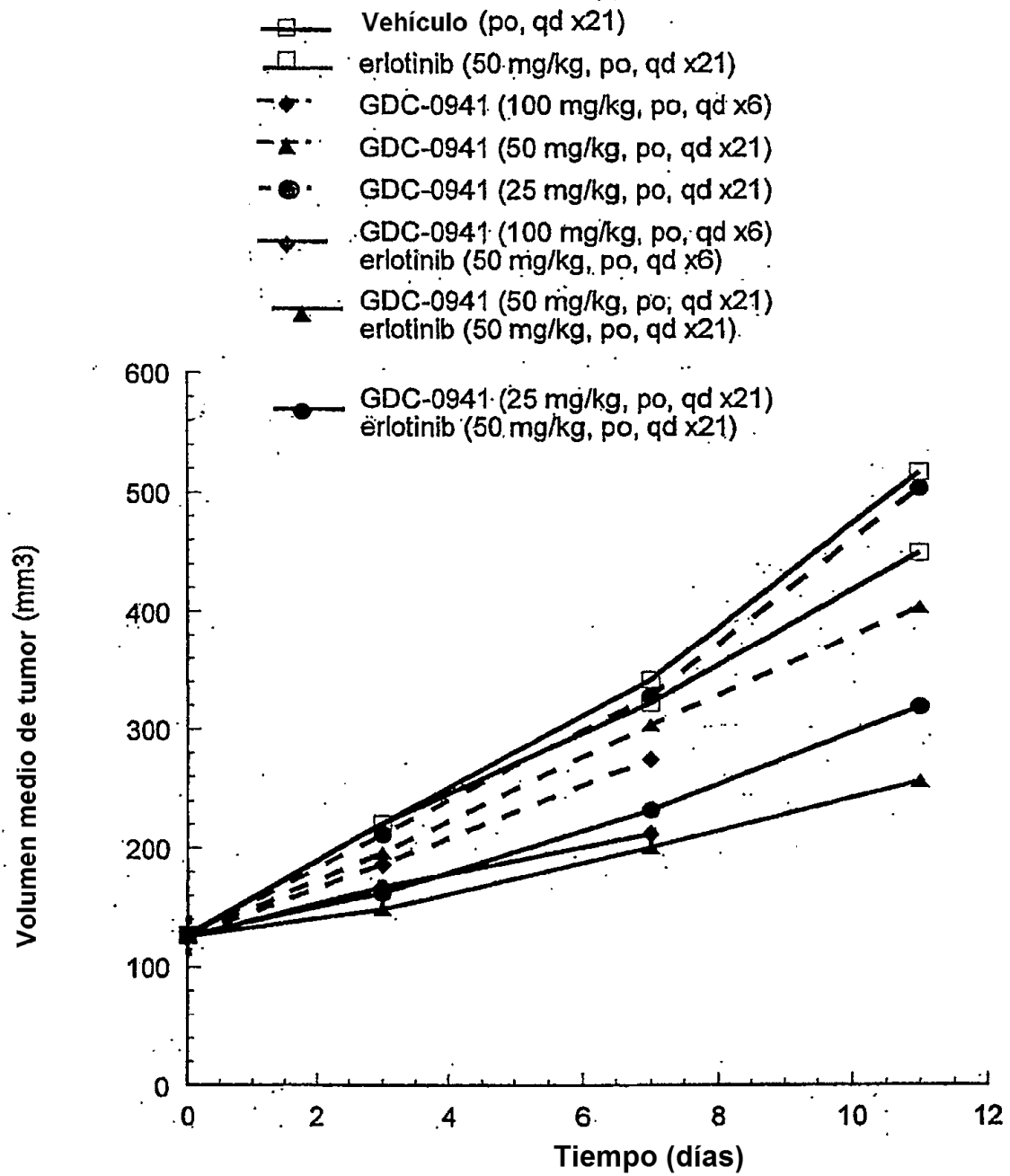


Figura 31

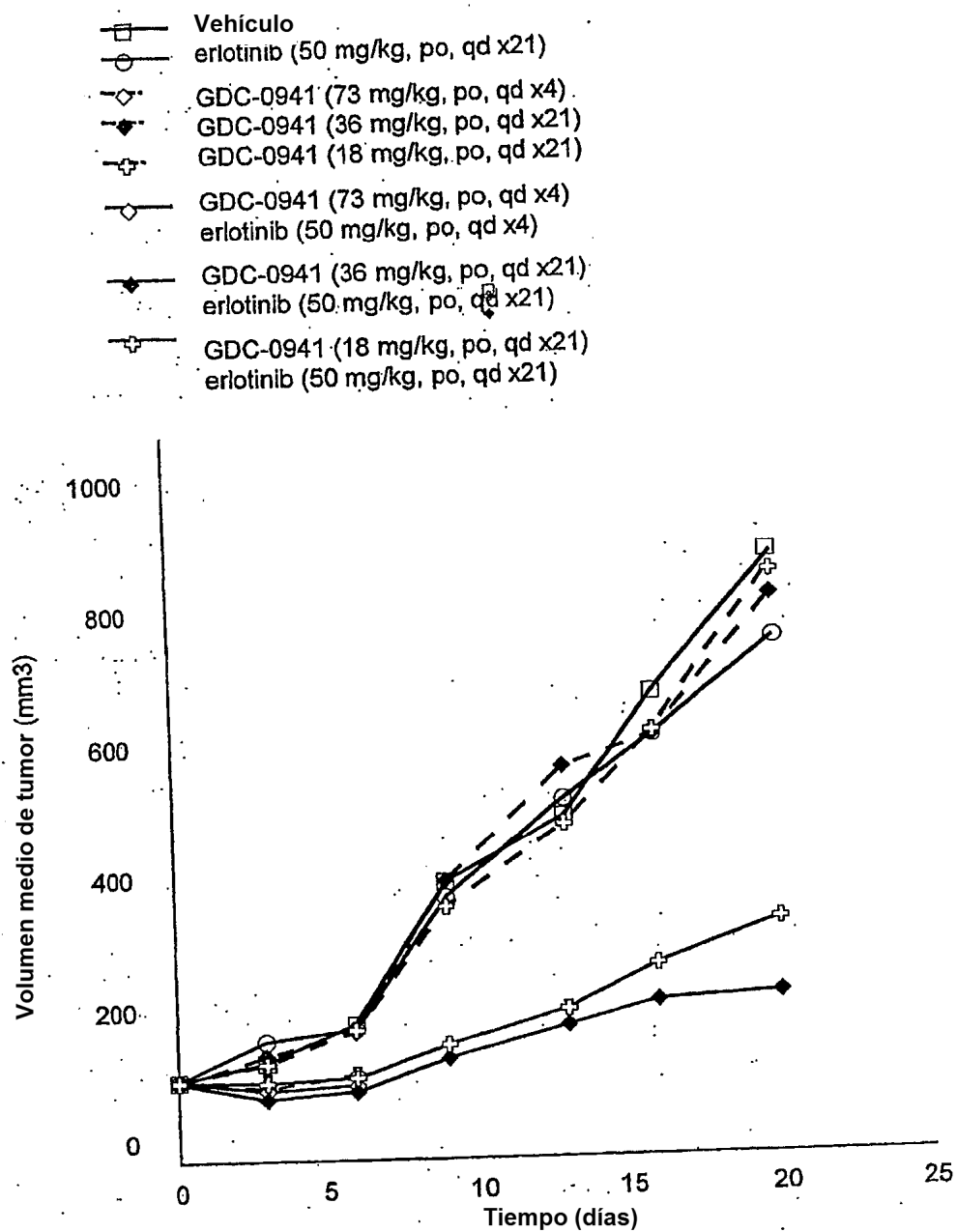


Figura 32

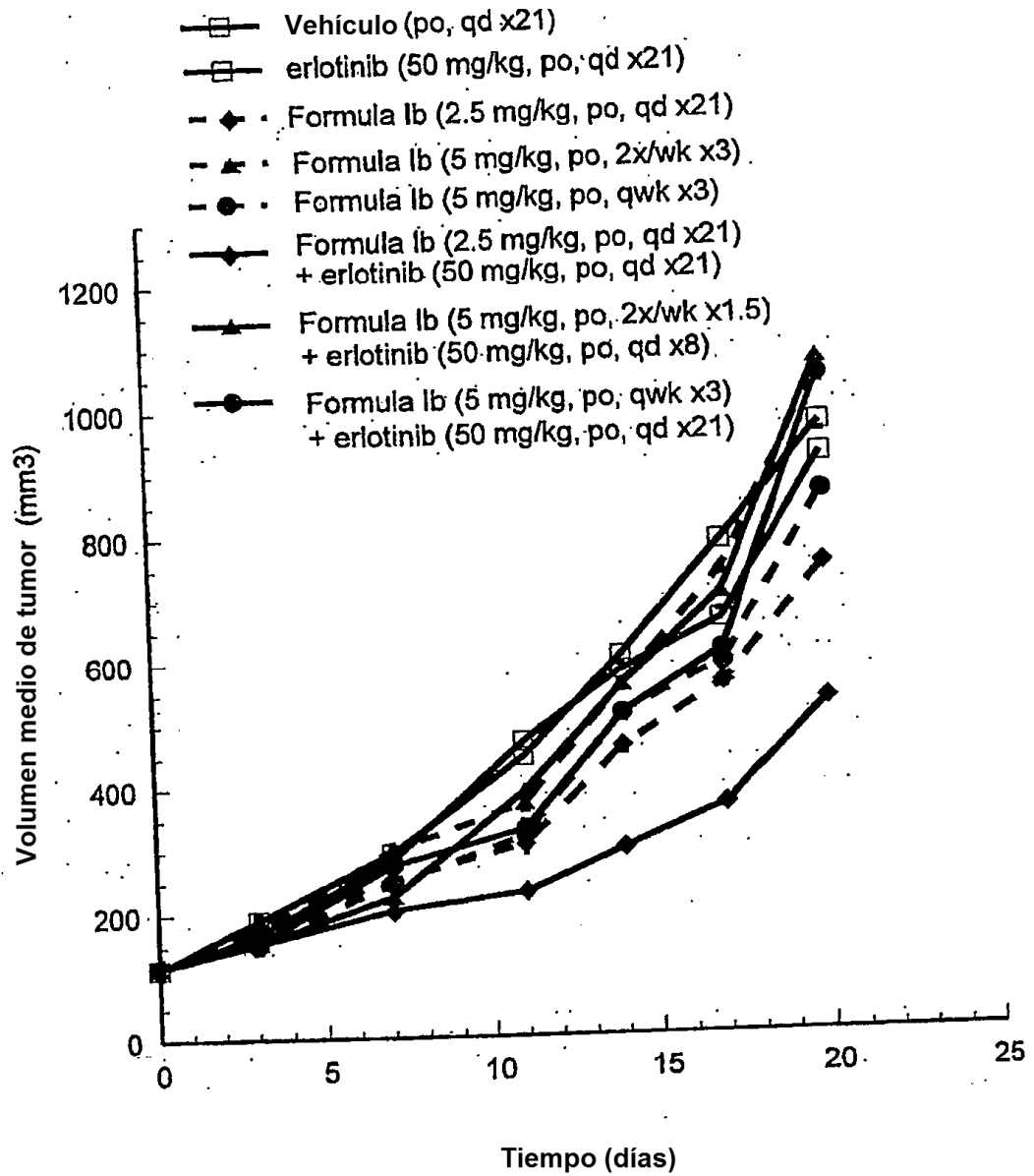


Figura 33

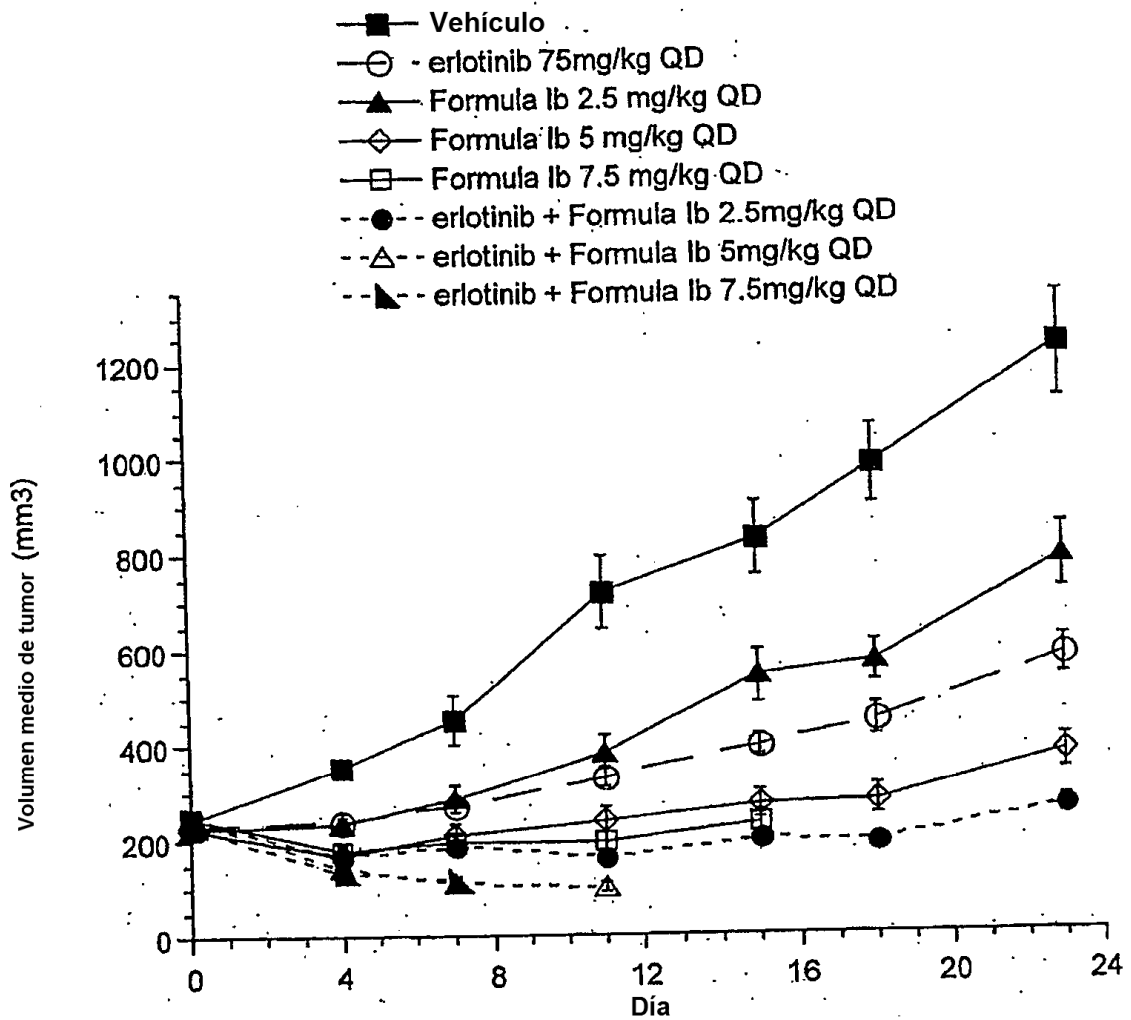


Figura 34

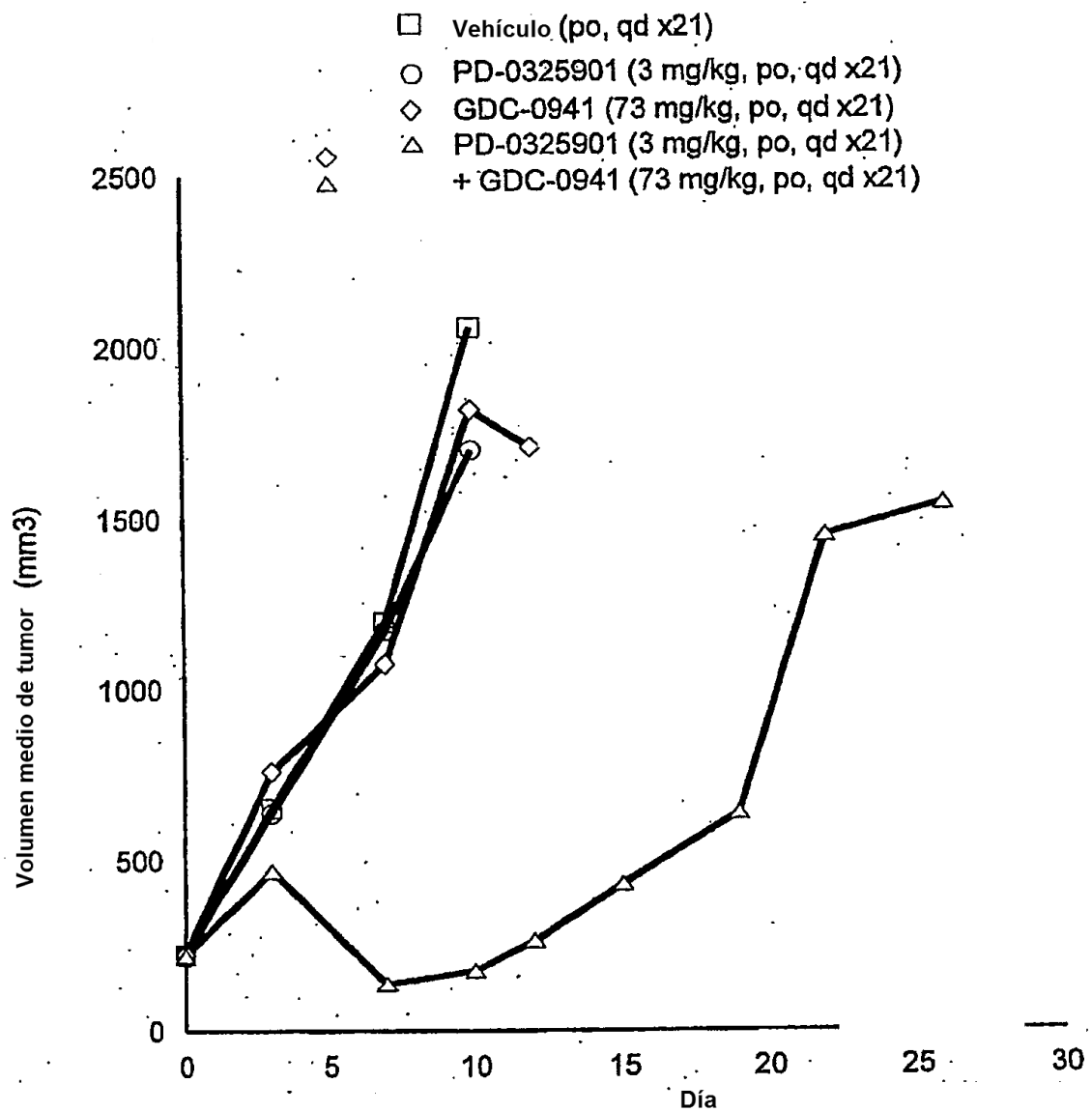


Figura 35

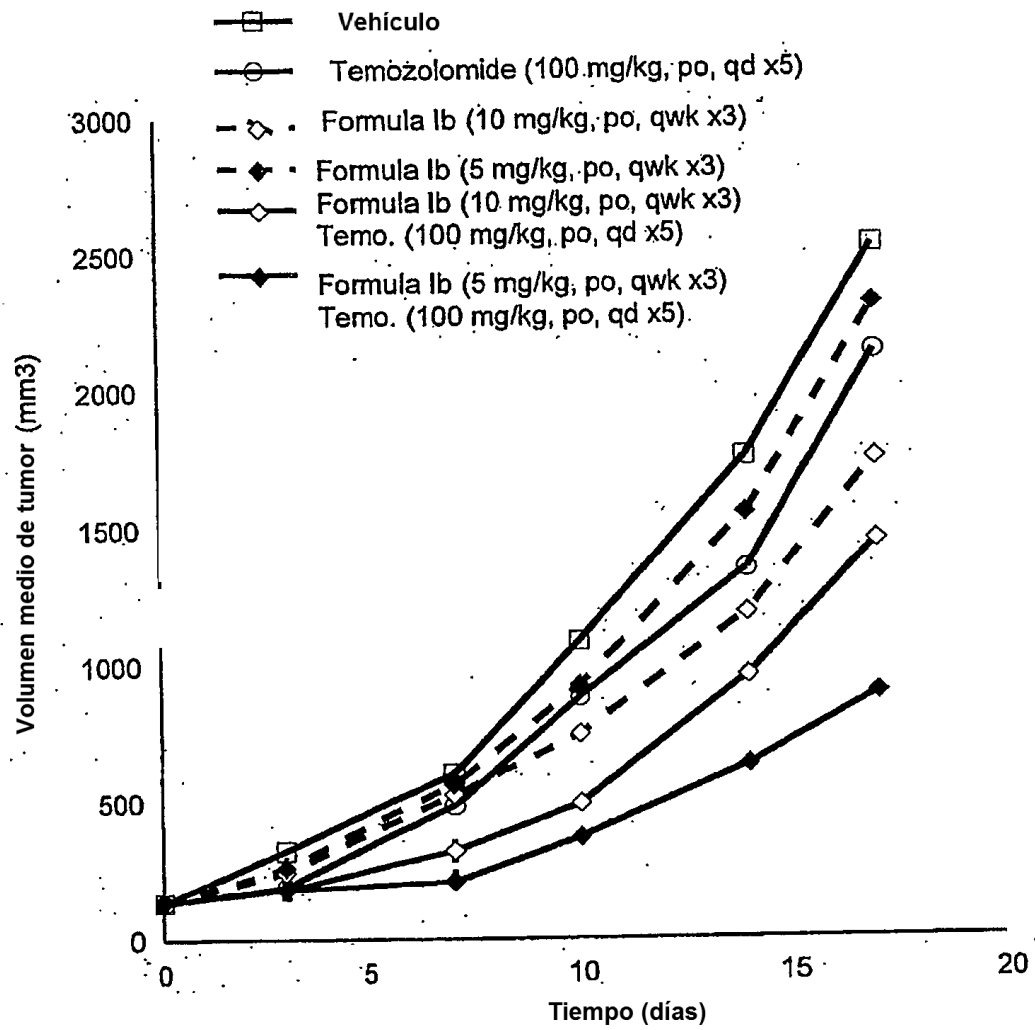


Figura 36

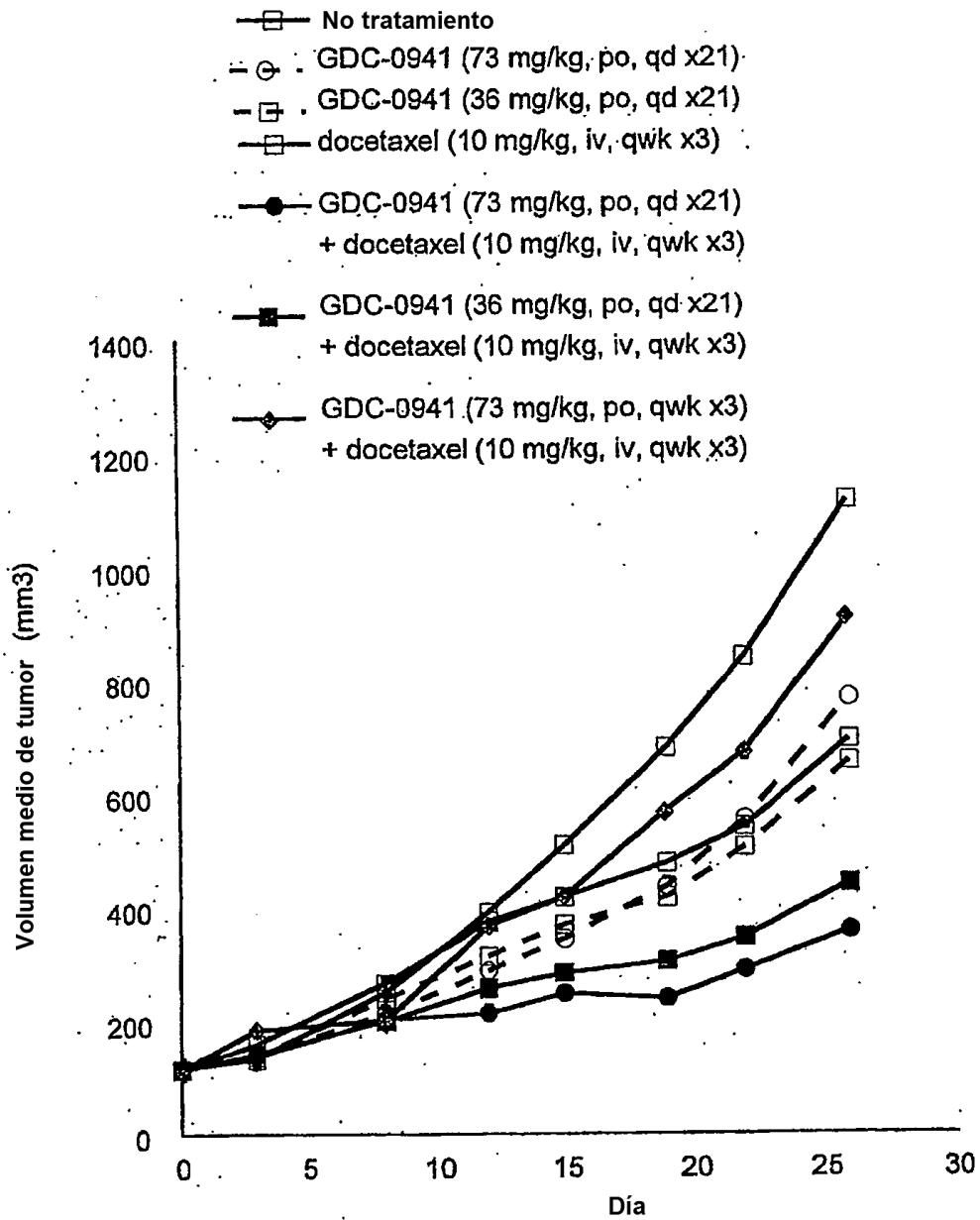


Figura 37

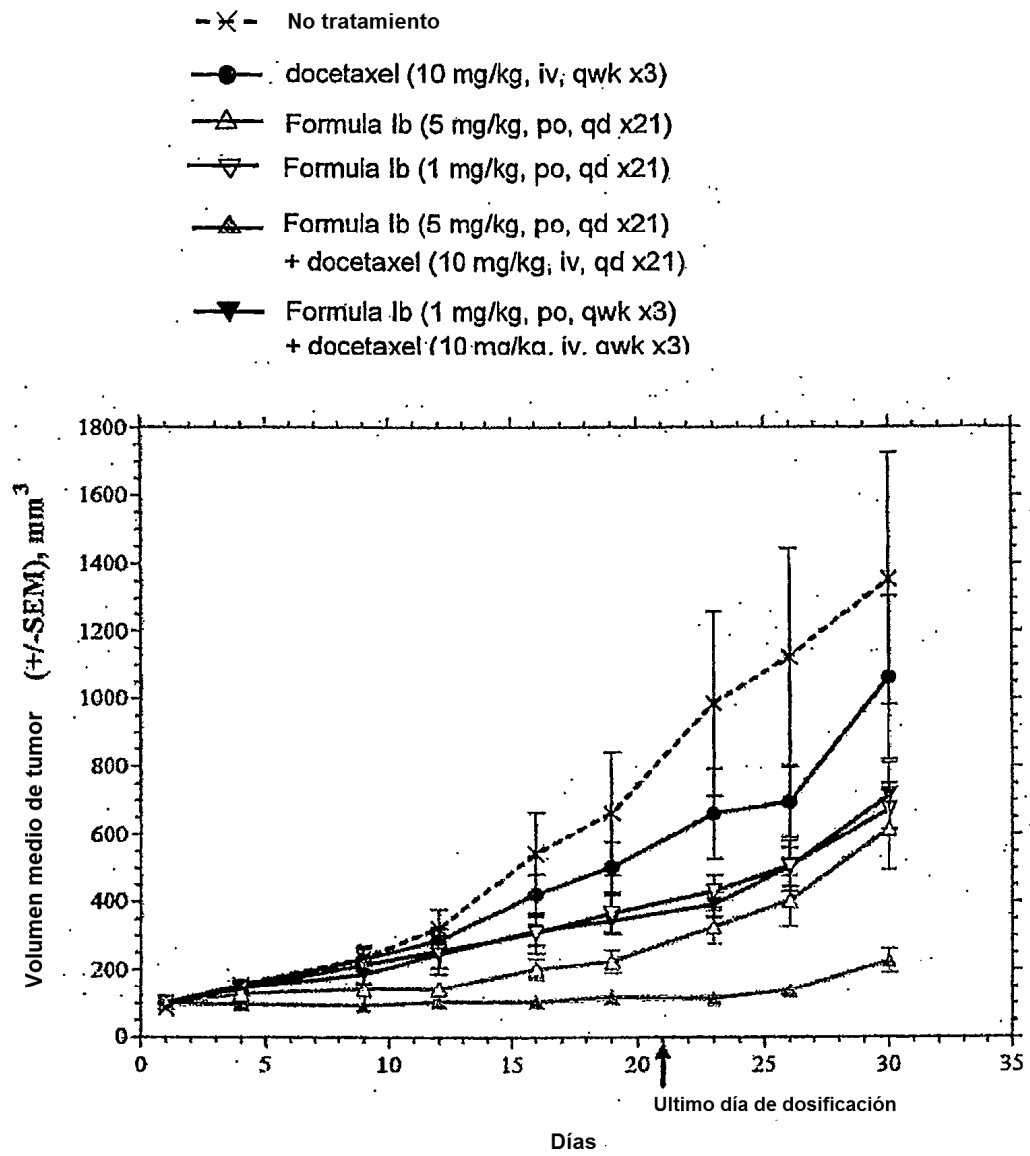


Figura 38

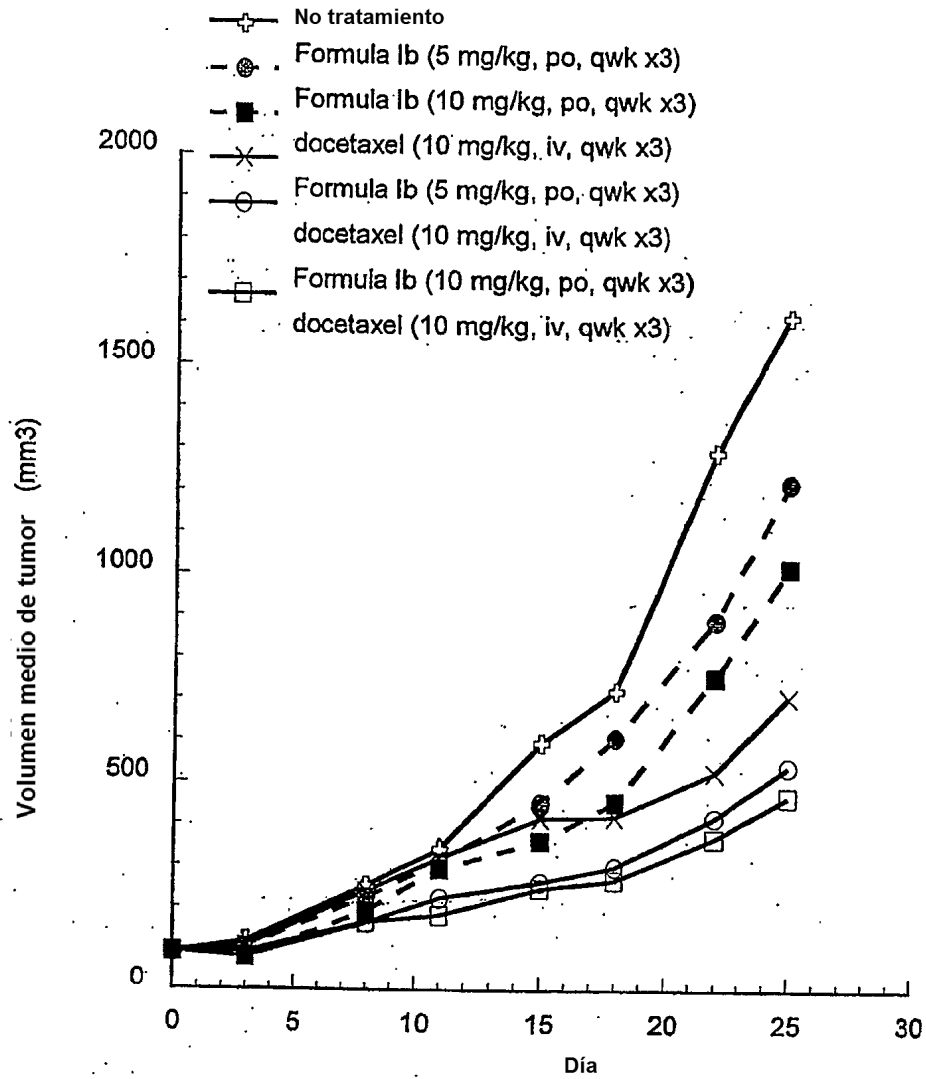


Figura 39

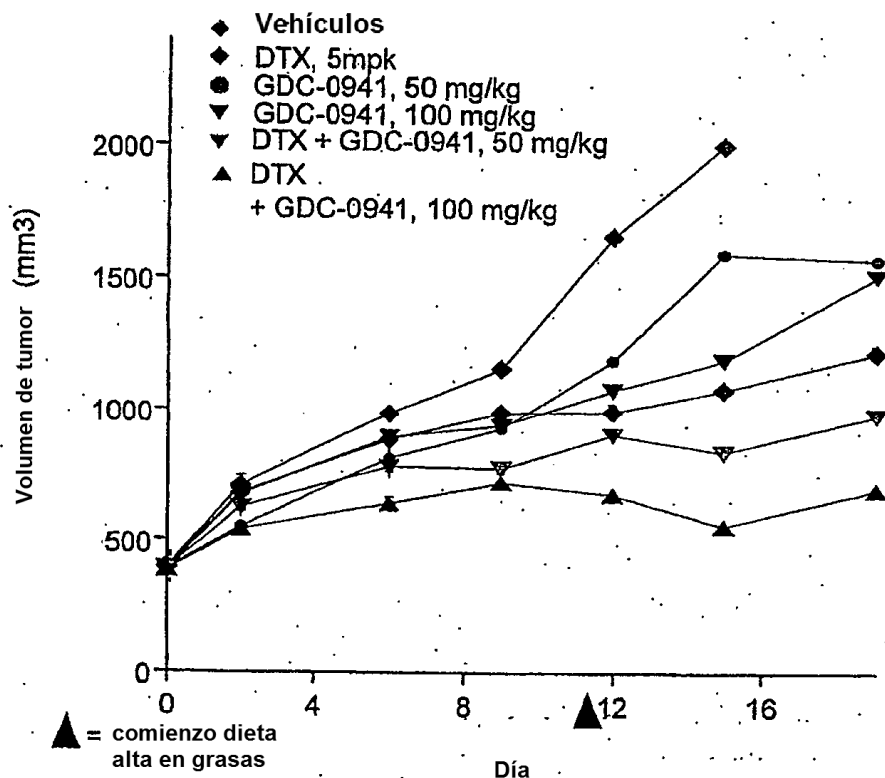


Figura 40

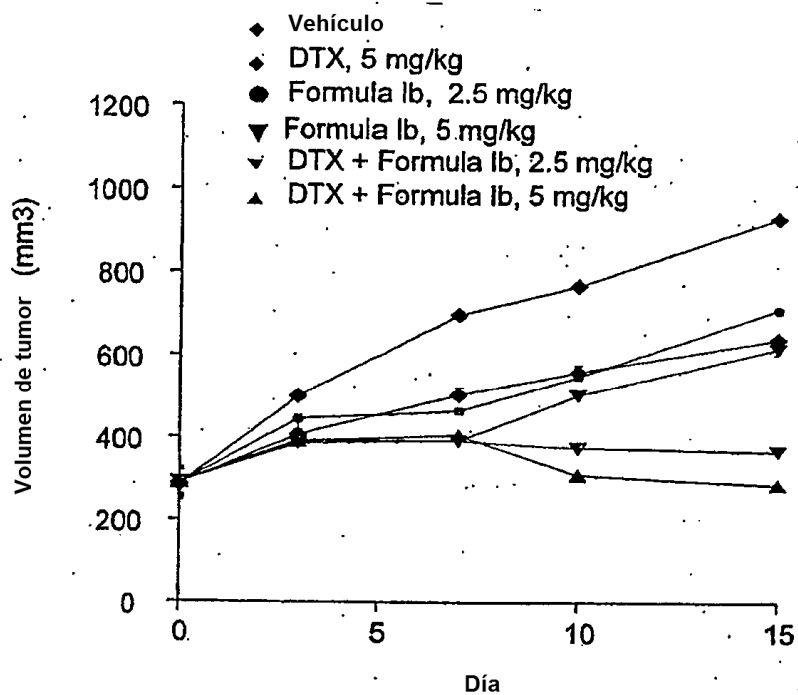


Figura 41

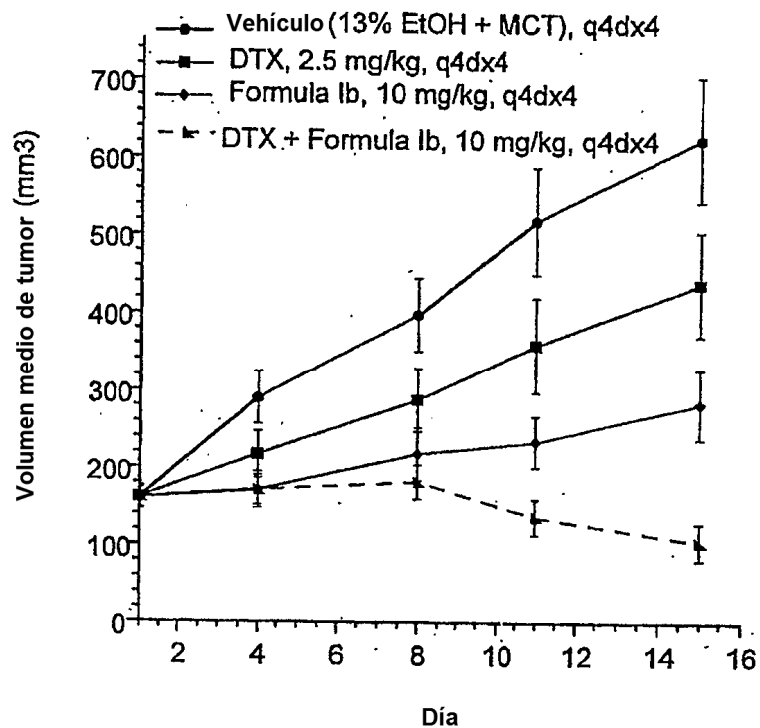


Figura 42

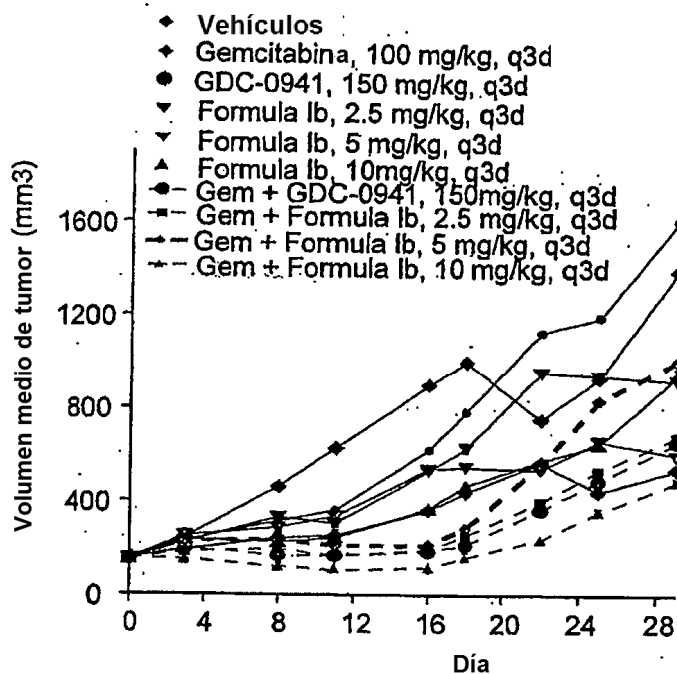


Figura 43

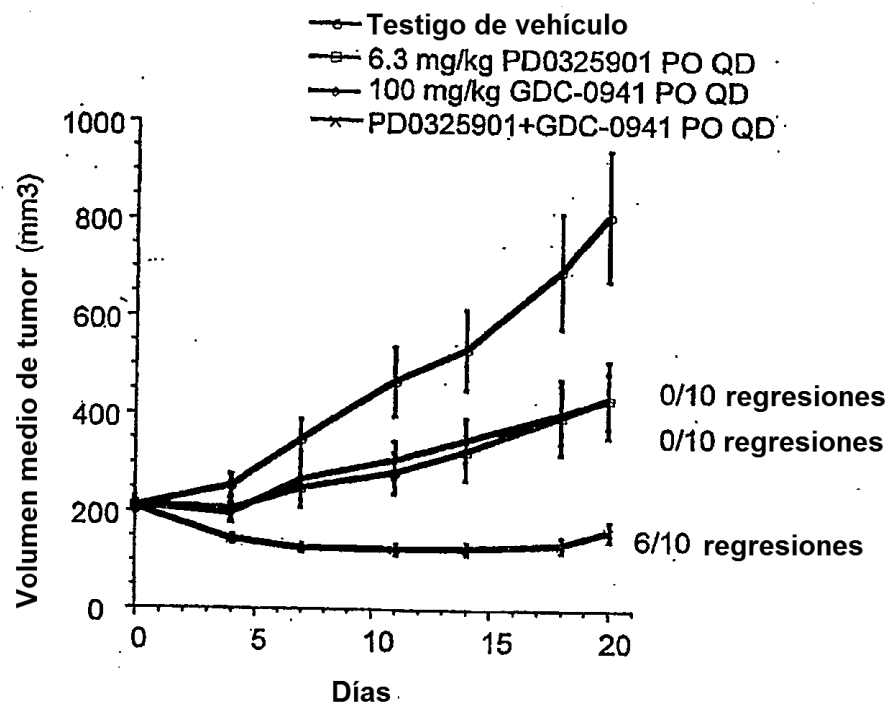


Figura 44