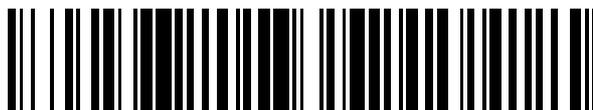


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 673**

51 Int. Cl.:

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09782777 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2331537**

54 Título: **Derivados de 1-((5-heteroariltiazol-2-il)aminocarbonil)pirrolidin-2-carboxamida como inhibidores de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) útiles en el tratamiento de enfermedades proliferativas**

30 Prioridad:

10.09.2008 EP 08164104

12.09.2008 US 96674 P

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

22.02.2016

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)

Lichtstrasse 35

4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

CARAVATTI, GIORGIO;

FAIRHURST, ROBIN ALEC;

FURET, PASCAL;

GUAGNANO, VITO y

IMBACH, PATRICIA

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 560 673 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

Derivados de 1-((5-heteroariltiazol-2-il)aminocarbonil)pirrolidin-2-carboxamida como inhibidores de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) útiles en el tratamiento de enfermedades proliferativas.

5 La presente invención se refiere a un derivado específico de 2-carboxamida-cicloaminourea, como nuevo compuesto inhibidor alfa-selectivo de fosfatidilinositol (PI) 3-cinasas. Esta invención también se refiere a composiciones, o bien solas o bien en combinación con al menos un agente terapéutico adicional, y opcionalmente en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Esta invención se refiere aún más al compuesto para su uso, o bien solo o bien en combinación con al menos un agente terapéutico adicional, en el tratamiento de varias enfermedades, en particular, aquellas mediadas por uno o más de actividad anómala de factores de crecimiento, tirosina cinasas
10 receptoras, proteína serina/heroína cinasas, receptores acoplados a proteínas G y fosfolípido cinasas y fosfatasa.

Las fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3K) comprenden una familia de lípido cinasas que catalizan la transferencia de fosfato a la posición D-3' de lípidos de inositol para producir fosfoinositol-3-fosfato (PIP), fosfoinositol-3,4-difosfato (PIP₂) y fosfoinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que, a su vez, actúan como segundos mensajeros en cascadas de señalización mediante el acoplamiento de proteínas que contienen dominios de homología a pleckstrina, FYVE, Phox y otros de unión a fosfolípidos en una variedad de complejos de señalización con frecuencia en la membrana plasmática ((Vanhaesebroeck *et al.*, Annu. Rev. Biochem 70:535 (2001); Katso *et al.*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615 (2001)). De las dos PI3K de clase 1, las PI3K de clase 1A son heterodímeros que se componen de una subunidad catalítica p110 (isoformas α , β , δ) asociada de manera constitutiva con una subunidad reguladora que puede ser p85 α , p55 α , p50 α , p85 β o p55 γ . La subclase 1B de la clase tiene un miembro de la familia, un heterodímero que se compone de una subunidad catalítica p110 γ asociada con una de dos subunidades reguladoras, p101 o p84 (Fruman *et al.*, Annu Rev. Biochem. 67:481 (1998); Suire *et al.*, Curr. Biol. 15:566 (2005)). Los dominios modulares de las subunidades p85/55/50 incluyen dominios de homología a Src (SH2) que se unen a residuos de fosfotirosina en un contexto de secuencia específico en tirosina cinasas citoplasmáticas y receptoras activadas, dando como resultado la activación y localización de PI3K de clase 1A. La PI3K de clase 1B se activa directamente por receptores acoplados a proteínas G que se unen a un repertorio diverso de ligandos peptídicos y no peptídicos (Stephens *et al.*, Cell 89:105 (1997)); Katso *et al.*, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 17:615-675 (2001)). Por consiguiente, los productos de fosfolípido resultantes de PI3K de clase I vinculan receptores anteriores con actividades celulares posteriores incluyendo proliferación, supervivencia, quimiotaxia, tráfico celular, motilidad, metabolismo, respuestas inflamatorias y alérgicas, transcripción y traducción (Cantley *et al.*, Cell 64:281 (1991); Escobedo y Williams, Nature 335:85 (1988); Fantl *et al.*, Cell 69:413 (1992)).
15
20
25
30

En muchos casos, PIP₂ y PIP₃ reclutan Akt, el producto del homólogo humano del oncogén viral *v-Akt*, en la membrana plasmática, donde actúa como punto nodal para muchas rutas de señalización intracelulares importantes para el crecimiento y la supervivencia (Fantl *et al.*, Cell 69:413-423(1992); Bader *et al.*, Nature Rev. Cancer 5:921 (2005); Vivanco y Sawyer, Nature Rev. Cancer 2:489 (2002)). La regulación aberrante de PI3K, que aumenta con frecuencia la supervivencia a través de la activación de Akt, es uno de los acontecimientos más prevalentes en el cáncer humano y se ha mostrado que se produce en múltiples niveles. El gen supresor de tumores *PTEN*, que desfosforila fosfoinosítidos en la posición 3' del anillo de inositol y al hacerlo antagoniza la actividad PI3K, está delecionado funcionalmente en una variedad de tumores. En otros tumores, los genes para la isoforma p110 α , *PIK3CA*, y para *Akt* están amplificados y se ha demostrado una expresión proteica aumentada de sus productos
35 génicos en varios cánceres humanos. Además, se han descrito mutaciones y la translocación de p85 α que sirven para regular por incremento el complejo p85-p110 en cánceres humanos. Finalmente, se han descrito mutaciones de cambio de sentido somáticas en *PIK3CA* que activan rutas de señalización posteriores a frecuencias significativas en una amplia diversidad de cánceres humanos (Kang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:802 (2005); Samuels *et al.*, Science 304:554 (2004); Samuels *et al.*, Cancer Cell 7:561-573 (2005)). Estas observaciones muestran que la desregulación de fosfoinositol-3 cinasa y los componentes anteriores y posteriores de esta ruta de señalización es una de las desregulaciones más comunes asociadas con cánceres humanos y enfermedades proliferativas (Parsons *et al.*, Nature 436:792 (2005); Hennessey *et al.*, Nature Rev. Drug Disc. 4:988-1004 (2005)).
40
45

En vista de lo anterior, los inhibidores de PI3K alfa serían de valor particular en el tratamiento de enfermedad proliferativa y otros trastornos.

50 El documento WO2004/096797 da a conocer determinados derivados de tiazol como inhibidores de PI3K gamma y su uso farmacéutico, particularmente para el tratamiento de estados inflamatorios y alérgicos.

El documento WO 2005/021519 también da a conocer determinados derivados de tiazol como inhibidores de PI3K gamma y su uso farmacéutico, particularmente para el tratamiento de estados inflamatorios y alérgicos.

55 El documento WO 2006/051270 también da a conocer determinados derivados de tiazol como inhibidores de PI3K alfa y su uso farmacéutico, particularmente debido a su actividad antitumoral.

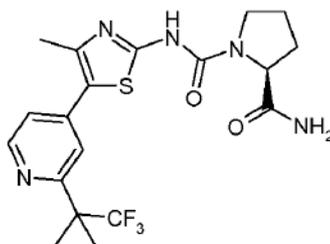
El documento WO 2007/129044 también da a conocer determinados derivados de tiazol como inhibidores de PI3K alfa y su uso farmacéutico, particularmente debido a su actividad antitumoral.

5 En vista de la técnica anterior, existe la necesidad de proporcionar compuestos adicionales adecuados para el tratamiento de enfermedades proliferativas, particularmente proporcionar compuestos que tengan selectividad mejorada y / o actividad mayor / mejorada.

10 Se ha encontrado ahora que el derivado de 2-carboxamida-cicloaminourea de la invención facilitado a continuación tiene propiedades farmacológicas ventajosas e inhibe, por ejemplo, PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa). En particular, este compuesto muestra selectividad por PI3K alfa con respecto a los subtipos beta y/o delta y/o gamma. Así, el compuesto de la invención es adecuado, por ejemplo, para usarse en el tratamiento de enfermedades que dependen de PI3 cinasas (en particular PI3K alfa, tal como las que muestran sobreexpresión o amplificación de PI3K alfa, mutación somática de PIK3CA o mutaciones de línea germinal o mutación somática de PTEN o mutaciones y translocación de p85 α que sirven para regular por incremento el complejo p85-p110), especialmente enfermedades proliferativas tales como enfermedades tumorales y leucemias.

15 Además, este compuesto muestra preferiblemente estabilidad metabólica mejorada y por tanto aclaramiento reducido, lo que conduce a perfiles farmacocinéticos mejorados.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona el compuesto 2-amida y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il]-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, de estructura:



en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable.

20 La invención puede apreciarse de manera más completa mediante referencia a la siguiente descripción, incluyendo el siguiente glosario de términos y los ejemplos finales. Tal como se usa en el presente documento, los términos "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se usan en el presente documento en su sentido abierto, no limitativo.

25 Cualquier fórmula facilitada en el presente documento pretende representar los hidratos, solvatos y polimorfos de tales compuestos, y mezclas de los mismos.

30 Cualquier fórmula facilitada en el presente documento también pretende representar las formas no marcadas así como formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen estructuras representadas por las fórmulas facilitadas en el presente documento excepto en que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico seleccionado. Los ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I respectivamente. La invención incluye diversos compuestos marcados isotópicamente tal como se define en el presente documento, por ejemplo aquéllos en los que están presentes isótopos radiactivos, tales como ^3H , ^{13}C y ^{14}C . Tales compuestos marcados isotópicamente son útiles en estudios metabólicos (preferiblemente con ^{14}C), estudios de cinética de reacción (con, por ejemplo ^2H o ^3H), técnicas de detección u obtención de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) incluyendo ensayos de distribución tisular de fármacos o sustratos, o en el tratamiento radiactivo de pacientes. En particular, un compuesto marcado o con ^{18}F puede preferirse particularmente para estudios con PET o SPECT. En general, pueden prepararse compuestos marcados isotópicamente de esta invención y profármacos de los mismos llevando a cabo los procedimientos dados a conocer en los esquemas o los ejemplos y las preparaciones descritos a continuación sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente disponible fácilmente.

Además, la sustitución por isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo aumento de la semivida *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación o una mejora del índice terapéutico. Se entiende que el

deuterio en este contexto se considera un sustituyente de un compuesto de la invención. La concentración de un isótopo más pesado de este tipo, específicamente deuterio, puede definirse mediante el factor de enriquecimiento isotópico. El término "factor de enriquecimiento isotópico" tal como se usa en el presente documento significa la razón entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo especificado. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención se indica como deuterio, tal compuesto tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de al menos 3500 (incorporación de deuterio del 52,5% en cada átomo de deuterio designado), al menos 4000 (incorporación de deuterio del 60%), al menos 4500 (incorporación de deuterio del 67,5%), al menos 5000 (incorporación de deuterio del 75%), al menos 5500 (incorporación de deuterio del 82,5%), al menos 6000 (incorporación de deuterio del 90%), al menos 6333,3 (incorporación de deuterio del 95%), al menos 6466,7 (incorporación de deuterio del 97%), al menos 6600 (incorporación de deuterio del 99%), o al menos 6633,3 (incorporación de deuterio del 99,5%). En los compuestos de esta invención, cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo. A menos que se establezca de otro modo, cuando se designa una posición específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene hidrógeno a su composición isotópica de abundancia natural. Por consiguiente, en los compuestos de esta invención cualquier átomo designado específicamente como deuterio (D) pretende representar deuterio, por ejemplo en los intervalos facilitados anteriormente.

Cuando se usa la forma plural (por ejemplo compuestos, sales), esta incluye el singular (por ejemplo un único compuesto, una única sal). "Un compuesto" no excluye que esté presente (por ejemplo en una formulación farmacéutica) más de un compuesto de la invención (o una sal del mismo).

Las siguientes definiciones generales se aplicarán en esta memoria descriptiva, a menos que se especifique de otro modo:

Halógeno (o halo) indica flúor, bromo, cloro o yodo, en particular flúor, cloro. Los grupos y restos sustituidos con halógeno, tales como alquilo sustituido con halógeno (haloalquilo) pueden estar mono, poli o perhalogenados.

"Tratamiento" incluye tratamiento profiláctico (preventivo) y terapéutico así como el retardo de la progresión de una enfermedad o un trastorno.

"Enfermedades mediadas por PI3 cinasas" (especialmente enfermedades mediadas por PI3K alfa o enfermedades mediadas por la sobreexpresión o amplificación de PI3K alfa, mutación somática de PIK3CA o mutaciones de línea germinal o mutación somática de PTEN o mutaciones y translocación de p85 α que sirven para regular por incremento el complejo p85-p110), son especialmente trastornos tales que responden de manera beneficiosa (por ejemplo mejora de uno o más síntomas, retraso de la aparición de una enfermedad, hasta la curación temporal o completa de una enfermedad) a la inhibición de una PI3 cinasa, especialmente inhibición de PI3K alfa o una forma mutante de la misma (donde pueden mencionarse especialmente entre las enfermedades que van a tratarse, enfermedades proliferativas tales como enfermedades tumorales y leucemias).

"Sales" (que, es lo que quiere decirse mediante "o sales de los mismos" u "o una sal de los mismos"), pueden estar presentes solas o en mezcla con compuesto libre de la invención y son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales se forman, por ejemplo, como sales de adición de ácido, preferiblemente con ácidos orgánicos o inorgánicos, a partir de compuestos de la invención con un átomo de nitrógeno básico, especialmente las sales farmacéuticamente aceptables. Ácidos inorgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos halogenados, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico. Ácidos orgánicos adecuados son, por ejemplo, ácidos carboxílicos o ácidos sulfónicos, tales como ácido fumárico o ácido metanosulfónico. Para fines de aislamiento o purificación, también es posible usar sales farmacéuticamente no aceptables, por ejemplo picratos o percloratos. Para uso terapéutico, sólo se emplean compuestos libres o sales farmacéuticamente aceptables (cuando sea aplicable en forma de preparaciones farmacéuticas), y por tanto se prefieren estos. En vista de la estrecha relación entre los compuestos novedosos en forma libre y aquéllos en forma de sus sales, incluyendo aquellas sales que pueden usarse como productos intermedios, por ejemplo en la purificación o identificación de los compuestos novedosos, cualquier referencia a los compuestos libres anteriormente en el presente documento y a continuación en el presente documento se entiende que se refiere también a las correspondientes sales, según sea apropiado y conveniente. Las sales de compuestos de la invención son preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables; se conocen en el campo contraiones adecuados que forman sales farmacéuticamente aceptables.

"Combinación" se refiere o bien a una combinación fijada en una forma unitaria de dosificación, o bien a un kit de partes para la administración combinada en la que un compuesto de la invención y una pareja de combinación (por ejemplo otro fármaco tal como se explica a continuación, también denominado "agente terapéutico" o "coagente") pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado en intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que las parejas de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo sinérgico. Los términos "coadministración" o "administración combinada" o similar tal como se usan en el presente documento pretenden englobar la administración de la pareja de combinación seleccionada a un único sujeto que lo necesita (por ejemplo un paciente), y pretenden incluir regímenes de tratamiento en los que los agentes no se administran necesariamente por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término

5 “combinación farmacéutica” tal como se usa en el presente documento significa un producto que resulta del mezclado o la combinación de más de un principio activo e incluye combinaciones tanto fijadas como no fijadas de los principios activos. El término “combinación fijada” significa que los principios activos, por ejemplo un compuesto de la invención y una pareja de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en forma de una única entidad o dosificación. El término “combinación no fijada” significa que los principios activos, por ejemplo un compuesto de la invención y una pareja de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas de manera o bien simultánea, concurrente o bien secuencial sin límites temporales específicos, en la que tal administración proporciona niveles terapéuticamente eficaces de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Esta última también se aplica a la terapia en cóctel, por ejemplo la administración de tres o más principios activos.

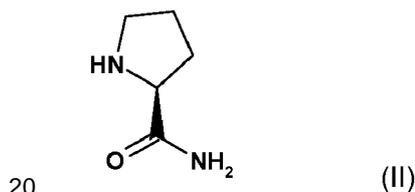
10 En realizaciones preferidas, que se prefieren independientemente, de manera colectiva o en cualquier combinación o subcombinación, la invención se refiere a un compuesto de la invención, en forma de base libre o en forma de sal de adición de ácido, en la que los sustituyentes son tal como se definen en el presente documento.

Pueden proporcionarse profármacos farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención.

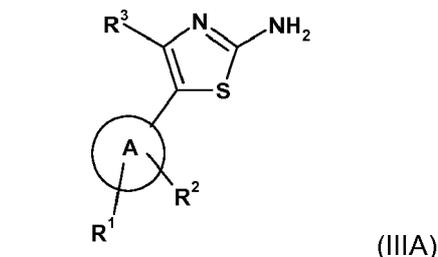
Pueden proporcionarse metabolitos farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención.

15 La presente invención también se refiere a procedimientos para la producción de un compuesto de la invención. En principio, todos los procedimientos conocidos que convierten dos aminas diferentes en un derivado de urea correspondiente son adecuados y pueden aplicarse usando el material de partida respectivo.

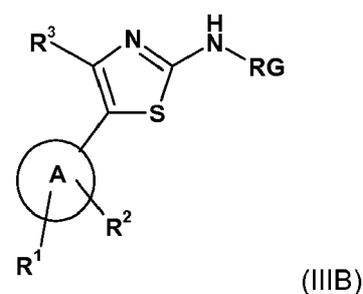
Por tanto, la invención se refiere en particular a un procedimiento para fabricar un compuesto de la invención, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)



o bien con un compuesto de fórmula (IIIA)

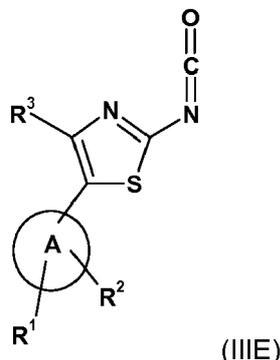


en la que los sustituyentes y A se definen como corresponden al compuesto de la invención en el presente documento y R³ puede representar adicionalmente cloro, en presencia de un agente de activación (“método A”), o bien con un compuesto de fórmula (IIIB)



en la que R¹ y R² se definen como corresponden al compuesto de la invención en el presente documento, R³ se define como corresponde al compuesto de la invención en el presente documento y puede representar adicionalmente cloro y RG representa un grupo reactivo, tal como imidazolilcarbonilo, que puede reaccionar

directamente o mediante la formación del producto intermedio de isocianato de fórmula (III E) ("método B"),



en la que los sustituyentes son tal como se definen en (IIIB),

5 en cada caso opcionalmente en presencia de un diluyente y opcionalmente en presencia de un adyuvante de reacción y

recuperar el compuesto de la invención resultante en forma libre o en forma de una sal y, opcionalmente convertir un compuesto de la invención, que puede obtenerse según el método A o el método B, en un compuesto diferente, y/o convertir una sal que puede obtenerse de un compuesto de la invención en una sal diferente del mismo, y/o convertir un compuesto libre de la invención que puede obtenerse en una sal del mismo, y/o separar un isómero que puede obtenerse de un compuesto de la invención de uno o más isómeros que pueden obtenerse diferentes del compuesto de la invención.

10

Condiciones de reacción

El procedimiento puede realizarse según métodos conocidos en la técnica, o tal como se da a conocer a continuación en los ejemplos. Por ejemplo un compuesto de fórmula II puede hacerse reaccionar con un compuesto de fórmula III en un disolvente, por ejemplo dimetilformamida, en presencia de una base por ejemplo una amina orgánica, por ejemplo trietilamina.

15

Cuando se facilitan temperaturas antes en el presente documento o a continuación en el presente documento, ha de añadirse "aproximadamente", ya que son tolerables desviaciones menores con respecto a los valores numéricos facilitados, por ejemplo variaciones de $\pm 10\%$.

20 Todas las reacciones pueden tener lugar en presencia de uno o más diluyentes y/o disolventes. Los materiales de partida pueden usarse en cantidades equimolares; alternatively, un compuesto puede usarse en exceso, por ejemplo para que funcione como disolvente o para desplazar el equilibrio o para acelerar en general las velocidades de reacción.

25 Pueden añadirse adyuvantes de reacción, tales como ácidos, bases o catalizadores en cantidades adecuadas, tal como se conoce en el campo, se requiere por una reacción y en línea con procedimientos conocidos en general.

Grupos protectores

Si uno o más de otros grupos funcionales, por ejemplo carboxilo, hidroxilo, amino, sulfhidrilo o similares están protegidos o es necesario protegerlos en un material de partida tal como se describe en el presente documento o cualquier otro precursor, porque no deben participar en la reacción o alterar la reacción, estos son grupos tales como los usados habitualmente en la síntesis de compuestos peptídicos, y también de cefalosporinas y penicilinas, así como derivados de ácido nucleico y azúcares. Los grupos protectores son grupos tales que ya no están presentes en los compuestos finales una vez que se eliminan, mientras que los grupos que permanecen como sustituyentes no son grupos protectores en el sentido usado en el presente documento, que son grupos que se añaden en un material de partida o fase intermedia y se eliminan para obtener un compuesto final.

30

35 Los grupos protectores pueden estar ya presentes en precursores y deben proteger los grupos funcionales referidos frente a reacciones secundarias no deseadas, tales como acilaciones, eterificaciones, esterificaciones, oxidaciones, solvólisis, y reacciones similares. Es una característica de los grupos protectores que se prestan fácilmente por sí mismos, es decir sin reacciones secundarias no deseadas, a la eliminación, normalmente mediante acetólisis, protonólisis, solvólisis, reducción, fotólisis o también mediante actividad enzimática, por ejemplo en condiciones análogas a las condiciones fisiológicas, y que no están presentes en los productos finales. El especialista sabe, o

40

puede establecer fácilmente, qué grupos protectores son adecuados con las reacciones mencionadas anteriormente y a continuación.

5 La protección de tales grupos funcionales mediante tales grupos protectores, los propios grupos protectores y sus reacciones de eliminación se describen, por ejemplo, en obras de referencia convencionales, tales como J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T. W. Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en "The Peptides"; Volumen 3 (editores: E. Gross and J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en "Methoden der organischen Chemie" (*Métodos de química orgánica*), Houben Weyl, 4ª edición, Volumen 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine" (*Aminoácidos, péptidos, proteínas*), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach y Basilea 1982, y en Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide und Derivate" (*Química de hidratos de carbono: monosacáridos y derivados*), Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974.

Reacciones y conversiones opcionales

15 Pueden prepararse sales de un compuesto de la invención con un grupo formador de sal de manera conocida *per se*. Por tanto, pueden obtenerse sales de adición de ácido de compuestos de la invención mediante tratamiento con un ácido o con un reactivo de intercambio aniónico adecuado. Una sal con dos moléculas de ácido (por ejemplo un dihalogenuro de un compuesto de la invención) también puede convertirse en una sal con una molécula de ácido por compuesto (por ejemplo un monohalogenuro); esto puede realizarse mediante calentamiento hasta obtener una masa fundida, o por ejemplo mediante calentamiento como un sólido a alto vacío a temperatura elevada, por ejemplo de desde 130 hasta 170°C, expulsándose una molécula del ácido por molécula de un compuesto de la invención. Las sales pueden convertirse habitualmente en compuestos libres, por ejemplo mediante tratamiento con compuestos básicos adecuados, por ejemplo con carbonatos de metales alcalinos, hidrogenocarbonatos de metales alcalinos o hidróxidos de metales alcalinos, normalmente carbonato de potasio o hidróxido de sodio.

25 Pueden separarse mezclas estereoisoméricas, por ejemplo mezclas de diastereómeros, en sus isómeros correspondientes de manera conocida *per se* por medio de métodos de separación adecuados. Pueden separarse mezclas diastereoméricas, por ejemplo, en sus diastereómeros individuales por medio de cristalización fraccionada, cromatografía, distribución en disolventes, y procedimientos similares. Esta separación puede tener lugar o bien a nivel de un compuesto de partida o bien en un compuesto de la invención en sí mismo. Pueden separarse enantiómeros a través de la formación de sales diastereoméricas, por ejemplo mediante la formación de sal con un ácido quirál enantioméricamente puro, o por medio de cromatografía, por ejemplo mediante HPLC, usando sustratos cromatográficos con ligandos quirales.

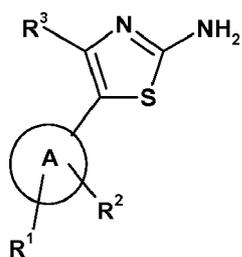
Debe hacerse hincapié en que reacciones análogas a las conversiones mencionadas en este capítulo también pueden tener lugar a nivel de productos intermedios apropiados (y son por tanto útiles en la preparación de materiales de partida correspondientes).

35 Materiales de partida:

Los materiales de partida de las fórmulas II y III, así como otros materiales de partida mencionados en el presente documento, por ejemplo a continuación, pueden prepararse según o de manera análoga a métodos que se conocen en la técnica, se conocen en la técnica y/o están disponibles comercialmente. En la medida en que la producción de los materiales de partida no se describe particularmente, los compuestos o bien se conocen o bien pueden prepararse de manera análoga a métodos conocidos en la técnica, por ejemplo en los documentos WO 05/021519 o WO04/096797, o tal como se da a conocer a continuación en el presente documento. Materiales de partida novedosos, así como procedimientos para la preparación de los mismos, son asimismo una realización de la presente invención. En las realizaciones preferidas, tales materiales de partida se usan y la reacción elegida se seleccionan de modo que permitan que se obtengan los compuestos preferidos.

45 En los materiales de partida (incluyendo productos intermedios), que también pueden usarse y/u obtenerse como sales cuando sea apropiado y conveniente, los sustituyentes son preferiblemente tal como se definen para un compuesto de la invención.

La divulgación en el presente documento también se refiere a compuestos de fórmula (IIIA) o una sal de los mismos



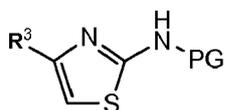
(III A)

en la que los sustituyentes son tal como se definen para un compuesto de la invención.

La presente divulgación se refiere además a procedimientos para la producción de un compuesto de fórmula (III A). En principio, todos los procedimientos conocidos que acoplan dos componentes de arilo / heteroarilo (tales como reacciones de tipo Heck) para dar un derivado de urea correspondiente son adecuados y pueden aplicarse usando el material de partida respectivo. Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (III A), que comprende

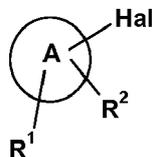
5

(Etapa 1) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IV)



(IV)

10 en la que R³ se define como corresponde a un compuesto de la invención en el presente documento y puede representar adicionalmente halo, PG representa un grupo de protección, tal como un grupo acilo, con un compuesto de fórmula (V)



(V)

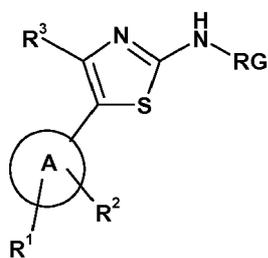
15 en la que R¹, R², A se definen como corresponden a un compuesto de la invención en el presente documento y Hal representa halo, tal como bromo, en condiciones de Heck; opcionalmente en presencia de un diluyente y opcionalmente en presencia de un adyuvante de reacción;

(Etapa 2) seguido por la eliminación del grupo protector, por ejemplo en condiciones ácidas; opcionalmente en presencia de un diluyente y opcionalmente en presencia de un adyuvante de reacción; y

recuperar el compuesto de fórmula (III A) resultante en forma libre o en forma de una sal y,

20 opcionalmente convertir un compuesto de fórmula (III A) obtenido en un compuesto diferente de fórmula (III A), y/o convertir una sal obtenida de un compuesto de fórmula (III A) en una sal diferente del mismo, y/o convertir un compuesto libre que puede obtenerse de fórmula (III A) en una sal del mismo, y/o separar un isómero que puede obtenerse de un compuesto de fórmula (III A) de uno o más isómeros obtenidos diferentes de fórmula (III A).

La presente divulgación se refiere además a compuestos de fórmula (III B) o una sal de los mismos

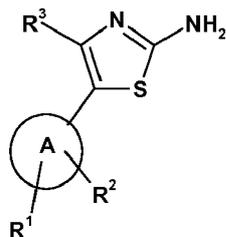


(III B)

25

en la que R^1 , R^2 , A se definen como corresponden a un compuesto de la invención, RG representa un grupo reactivo, particularmente imidazolilcarbonilo que puede reaccionar directamente o mediante la formación del producto intermedio de isocianato de fórmula (IIIE), y R^3 se define como corresponde a un compuesto de la invención en el presente documento y puede representar adicionalmente halo.

- 5 La presente divulgación se refiere además a procedimientos para la producción de un compuesto de fórmula (IIIB). En principio, todos los procedimientos conocidos que convierten una amina o sal de la misma en un derivado activado correspondiente son adecuados y pueden aplicarse usando el material de partida respectivo. Por tanto, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de fórmula (IIIB), que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (IIIA)



10 (IIIA)

en la que los sustituyentes son tal como se definen en el presente documento, con un reactivo de activación, tal como 1,1'-carbonildiimidazol, opcionalmente en presencia de un diluyente y opcionalmente en presencia de un adyuvante de reacción; y

recuperar el compuesto de fórmula (IIIB) resultante en forma libre o en forma de una sal, y

- 15 opcionalmente convertir un compuesto de fórmula (IIIB) obtenido en un compuesto diferente de fórmula (IIIB), y/o convertir una sal obtenida de un compuesto de fórmula (IIIB) en una sal diferente del mismo, y/o convertir un compuesto libre que puede obtenerse de fórmula (IIIB) en una sal del mismo, y/o separar un isómero que puede obtenerse de un compuesto de fórmula (IIIB) de uno o más isómeros obtenidos diferentes de fórmula (IIIB).

- 20 La invención se refiere en una realización a composiciones para uso humano o veterinario cuando está indicada inhibición de PI3K.

- La invención se refiere al tratamiento de enfermedades proliferativas celulares tales como tumor y/o crecimiento de células cancerosas mediadas por PI3K. Las enfermedades pueden incluir las que muestran sobreexpresión o amplificación de PI3K alfa, mutación somática de PIK3CA o mutaciones de línea germinal o mutación somática de PTEN o mutaciones y translocación de p85 α que sirven para regular por incremento el complejo p85-p110. En particular, los compuestos son útiles en el tratamiento de cánceres humanos o de animales (por ejemplo, murinos), incluyendo, por ejemplo, sarcoma; de pulmón; bronquio; próstata; mama (incluyendo cánceres de mama esporádicos y pacientes con enfermedad de Cowden); páncreas; cáncer gastrointestinal; de colon; recto; carcinoma de colon; adenoma colorrectal; de tiroides; hígado; vías biliares intrahepáticas; hepatocelular; de glándula suprarrenal; estómago; gástrico; glioma; glioblastoma; endometrial; melanoma; de riñón; pelvis renal; vejiga urinaria; cuerpo uterino; cuello uterino; vagina; ovario; mieloma múltiple; de esófago; una leucemia; leucemia mielógena aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia linfocítica; leucemia mielóide; cerebral; un carcinoma del cerebro; cavidad oral y faringe; laringe; intestino delgado; linfoma no Hodgkin; melanoma; adenoma vellosa de colon; una neoplasia; una neoplasia de carácter epitelial; linfomas; un carcinoma de mama; carcinoma de células basales; carcinoma de células escamosas; queratosis actínica; enfermedades tumorales, incluyendo tumores sólidos; un tumor de cabeza o cuello; policitemia vera; trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mielóide; y enfermedad de Walden-Stroem.

- El estado o trastorno (por ejemplo mediado por PI3K) también puede seleccionarse del grupo que consiste en: policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis con metaplasia mielóide, asma, EPOC, SDR, síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica, infestación parasitaria (en particular metazoaria) (incluyendo eosinofilia tropical), aspergilosis broncopulmonar, poliarteritis nodosa (incluyendo síndrome de Churg-Strauss), granuloma eosinofílico, trastornos relacionados con los eosinófilos que afectan a las vías respiratorias ocasionados por reacción farmacológica, psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, alopecia areata, eritema multiforme, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, vitiligo, aneigitis por hipersensibilidad, urticaria, penfigoide ampolloso, lupus eritematoso, pénfigo, epidermolísis ampollosa adquirida, trastornos hematológicos autoinmunitarios (por ejemplo anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de eritrocitos y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia grave, síndrome de Steven-Johnson, esprúe idiopático, enfermedad inflamatoria del intestino autoinmunitaria (por ejemplo colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, enfermedad de

5 Graves, sarcoidosis, alveolitis, neumonía por hipersensibilidad crónica, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, uveítis (anterior y posterior), fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriásica, glomerulonefritis, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolia, embolia pulmonar, enfermedades trombolíticas, isquemia arterial aguda, oclusiones tromboticas periféricas y arteriopatía coronaria, lesiones por reperfusión, retinopatía, tal como retinopatía diabética o retinopatía inducida por oxígeno hiperbárico, y estados caracterizados por presión ocular elevada o secreción de humor acuoso ocular, tales como glaucoma.

10 Para los usos anteriores, la dosificación requerida variará naturalmente dependiendo del modo de administración, el estado particular que vaya a tratarse y el efecto deseado. En general, se indica que se obtienen resultados satisfactorios de manera sistémica a dosificaciones diarias de desde aproximadamente 0,03 hasta aproximadamente 100,0 mg/kg de peso corporal, por ejemplo de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 10,0 mg/kg de peso corporal. Una dosificación diaria indicada en el mamífero superior, por ejemplo seres humanos, está en el intervalo de desde aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 3 g, por ejemplo de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 1,5 g, administrada de manera conveniente, por ejemplo, en dosis divididas hasta cuatro veces al día o en forma retardada. Las formas de dosificación unitarias adecuadas para administración oral comprenden desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 500 mg, por ejemplo de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 500 mg de principio activo.

20 El compuesto puede administrarse por cualquier vía convencional, en particular por vía enteral, por ejemplo por vía oral, por ejemplo en forma de comprimidos o cápsulas, o por vía parenteral, por ejemplo en forma de disoluciones o suspensiones inyectables, de manera tópica, por ejemplo en forma de lociones, geles, pomadas o cremas, por inhalación, por vía intranasal, o en forma de supositorio.

El compuesto puede administrarse en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo tal como se indicó anteriormente. Tales sales pueden prepararse de manera convencional y presentan el mismo orden de actividad que los compuestos libres.

25 Por consiguiente, la invención también proporciona:

- un compuesto de la invención, en forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable como producto farmacéutico, por ejemplo en cualquiera de los métodos indicados en el presente documento.
- un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable para su uso como producto farmacéutico, por ejemplo en cualquiera de los métodos indicados en el presente documento, en particular para el uso en una o más enfermedades mediadas por fosfatidilinositol 3-cinasas.
- el uso de un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable en cualquiera de los métodos indicados en el presente documento, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una o más enfermedades mediadas por fosfatidilinositol 3-cinasas.

35 PI3K sirve como nodo de segundo mensajero que integra rutas de señalización paralelas, están surgiendo pruebas de que la combinación de un inhibidor de PI3K con inhibidores de otras rutas será útil en el tratamiento de cáncer y enfermedades proliferativas en seres humanos.

40 Aproximadamente el 20-30% de los cánceres de mama humanos sobreexpresan Her-2/neu-ErbB2, la diana para el fármaco trastuzumab. Aunque trastuzumab ha demostrado respuestas duraderas en algunos pacientes que expresan Her2/neu-ErbB2, sólo un subconjunto de estos pacientes responden. Un trabajo reciente ha indicado que esta tasa de respuesta limitada puede mejorarse sustancialmente mediante la combinación de trastuzumab con inhibidores de PI3K o la ruta PI3K/AKT (Chan *et al.*, Breast Can. Res. Treat. 91:187 (2005), Woods Ignatoski *et al.*, Brit. J. Cancer 82:666 (2000), Nagata *et al.*, Cancer Cell 6:117 (2004)).

45 Una variedad de tumores malignos humanos expresan mutaciones activantes o niveles aumentados de Her1/EGFR y se han desarrollado varios inhibidores de anticuerpo y molécula pequeña frente a esta tirosina cinasa receptora incluyendo tarceva, gefitinib y erbitux. Sin embargo, aunque los inhibidores de EGFR demuestran actividad antitumoral en determinados tumores humanos (por ejemplo, NSCLC), no logran aumentar la supervivencia global del paciente en todos los pacientes con tumores que expresan EGFR. Esto puede racionalizarse mediante el hecho de que muchas dianas posteriores de Her1/EGFR están mutadas o desreguladas a altas frecuencias en una variedad de tumores malignos, incluyendo la ruta PI3K/Akt. Por ejemplo, gefitinib inhibe el crecimiento de una línea celular de adenocarcinoma en ensayos *in vitro*. No obstante, pueden seleccionarse subclones de estas líneas celulares que son resistentes a gefitinib que demuestran un aumento de la activación de la ruta PI3/Akt. La regulación por disminución o inhibición de esta ruta hace que los subclones resistentes sean sensibles a gefitinib (Kokubo *et al.*, Brit. J. Cancer 92:1711 (2005)). Además, en un modelo *in vitro* de cáncer de mama con una línea celular que alberga una mutación de PTEN y sobreexpresa EGFR, la inhibición tanto de la ruta PI3K/Akt como de

EGFR produjo un efecto sinérgico (She *et al.*, Cancer Cell 8:287-297(2005)). Estos resultados indican que la combinación de gefitinib e inhibidores de la ruta PI3K/Akt sería una estrategia terapéutica atractiva en el cáncer.

5 La combinación de AEE778 (un inhibidor de Her-2/neu/ErbB2, VEGFR y EGFR) y RAD001 (un inhibidor de mTOR, una diana posterior de Akt) produjo mayor eficacia combinada que cualquier agente solo en un modelo de xenoinjerto de glioblastoma (Goudar *et al.*, Mol. Cancer. Ther. 4:101-112 (2005)).

10 Los antiestrógenos, tales como tamoxifeno, inhiben el crecimiento de cáncer de mama a través de la inducción de detención del ciclo celular que requiere la acción del inhibidor del ciclo celular p27Kip. Recientemente, se ha mostrado que la activación de la ruta de Ras-Raf-MAP cinasa altera el estado de fosforilación de p27Kip de manera que se atenúa su actividad inhibidora en la detención del ciclo celular, contribuyendo de ese modo a la resistencia antiestrógenos (Donovan, *et al.*, J. Biol. Chem. 276:40888, (2001)). Tal como notificaron Donovan *et al.*, la inhibición de la señalización de MAPK a través de tratamiento con inhibidor de MEK revertió el estado de fosforilación aberrante de p27 en líneas celulares de cáncer de mama que no responden al tratamiento hormonal y al hacerlo restauró la sensibilidad hormonal. De manera similar, la fosforilación de p27Kip por Akt también suprime su papel para detener el ciclo celular (Viglietto *et al.*, Nat Med. 8:1145 (2002)).

15 Por consiguiente, el compuesto puede usarse en el tratamiento de cánceres hormonodependientes, tales como cánceres de mama y próstata. Mediante este uso, se tiene como objetivo revertir la resistencia hormonal observada comúnmente en estos cánceres con agentes anticancerígenos convencionales.

20 En cánceres hematológicos, tales como leucemia mielógena crónica (CML), la translocación cromosómica es responsable de la tirosina cinasa BCR-Abl activada de manera constitutiva. Los pacientes afectados responden a imatinib, un inhibidor de tirosina cinasa de molécula pequeña, como resultado de la inhibición de la actividad cinasa Abl. Sin embargo, muchos pacientes con enfermedad en estado avanzado responden a imatinib inicialmente, pero luego presentan recidiva más tarde debido a mutaciones que confieren resistencia en el dominio cinasa Abl. Estudios *in vitro* han demostrado que BCR-Abl emplea la ruta de Ras-Raf cinasa para provocar sus efectos. Además, la inhibición de más de una cinasa en la misma ruta proporciona protección adicional frente a mutaciones que confieren resistencia.

25 Por consiguiente, el compuesto pueden usarse en combinación con al menos un agente adicional seleccionado del grupo de inhibidores de cinasas, tales como Gleevec®, en el tratamiento de cánceres hematológicos, tales como leucemia mielógena crónica (CML). Mediante este uso, se tiene como objetivo revertir o prevenir la resistencia a dicho al menos un agente adicional.

30 Debido a que la activación de la ruta PI3K/Akt impulsa la supervivencia celular, la inhibición de la ruta en combinación con terapias que impulsan la apoptosis en células cancerosas, incluyendo radioterapia y quimioterapia, darán como resultado respuestas mejoradas (Ghobrial *et al.*, CA Cancer J. Clin 55:178-194 (2005)). Como ejemplo, la combinación de inhibidor de PI3 cinasa con carboplatino demostró efectos sinérgicos tanto en ensayos de proliferación y apoptosis *in vitro* así como en la eficacia frente a tumor *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de cáncer de ovario (Westfall y Skinner, Mol. Cancer Ther. 4:1764-1771 (2005)).

35 Además de cáncer y enfermedades proliferativas, existen pruebas acumuladas de que inhibidores de PI3 cinasas de clase 1A y 1B serán terapéuticamente útiles en otras áreas de enfermedad. Se ha mostrado que la inhibición de p110β, el producto de la isoforma PI3K del gen PIK3CB, está implicada en la activación de plaquetas inducida por cizallamiento (Jackson *et al.*, Nature Medicine 11:507-514 (2005)). Por tanto, un inhibidor de PI3K que inhiba p110β será útil como agente individual o en combinación en terapia antitrombótica. La isoforma p110δ, el producto del gen PIK3CD, es importante en la función y diferenciación de células B (Clayton *et al.*, J. Exp. Med. 196:753-763 (2002)), respuestas antigénicas dependientes e independientes de células T (Jou *et al.*, Mol. Cell. Biol. 22:8580-8590 (2002)) y diferenciación de mastocitos (Ali *et al.*, Nature 431:1007-1011 (2004)). Por tanto, se espera que los inhibidores de p110δ serán útiles en el tratamiento de asma y enfermedades autoinmunitarias impulsadas por células B. Finalmente, la inhibición de p110γ, el producto de la isoforma del gen PI3KCG, da como resultado una reducción de la respuesta de células T, pero no de células B (Reif *et al.*, J. Immunol. 173:2236-2240 (2004)) y su inhibición demuestra eficacia en modelos con animales de enfermedades autoinmunitarias (Camps *et al.*, Nature Medicine 11:936-943 (2005), Barber *et al.*, Nature Medicine 11:933-935 (2005)).

50 La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración a un sujeto humano o animal, o bien solo o bien junto con otros agentes anticancerígenos.

55 El compuesto de la invención puede usarse en métodos de tratamiento de sujetos humanos o animales que padecen una enfermedad proliferativa celular, tal como cáncer. Los métodos de tratamiento de un sujeto humano o animal que necesita tal tratamiento, comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención o bien solo o bien en combinación con uno o más de otros agentes anticancerígenos. En

particular, las composiciones o bien se formularán conjuntamente como un producto terapéutico de combinación o bien se administrarán por separado. Los agentes anticancerígenos para su uso con un compuesto de la invención adecuados incluyen, pero no se limitan a, uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en inhibidores de cinasas, antiestrógenos, antiandrógenos, otros inhibidores, fármacos quimioterápicos contra el cáncer, agentes alquilantes, agentes quelantes, modificadores de la respuesta biológica, vacunas contra el cáncer, agentes para terapia antisentido tal como se exponen a continuación:

A. Inhibidores de cinasas: Los inhibidores de cinasas para su uso como agentes anticancerígenos junto con el compuesto de la invención incluyen inhibidores de cinasas receptoras de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tales como quinazolininas de molécula pequeña, por ejemplo gefitinib (documentos US 5457105, US 5616582, y US 5770599), ZD-6474 (documento WO 01/32651), erlotinib (Tarceva®, documentos US 5.747.498 y WO 96/30347), y lapatinib (documentos US 6.727.256 y WO 02/02552); inhibidores de cinasas receptoras de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), incluyendo SU-11248 (documento WO 01/60814), SU 5416 (documentos US 5.883.113 y WO 99/61422), SU 6668 (documentos US 5.883.113 y WO 99/61422), CHIR-258 (documentos US 6.605.617 y US 6.774.237), vatalanib o PTK-787 (documento US 6.258.812), VEGF-Trap (documento WO 02/57423), B43-genisteína (documento WO-09606116), fenretinida (p-hidroxifenilamina del ácido retinoico) (documento US 4.323.581), IM-862 (documento WO 02/62826), bevacizumab o Avastin® (documento WO 94/10202), KRN-951, 3-[5-(metilsulfonilpiperadin-metil)-indolil]-quinolona, AG-13736 y AG-13925, pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazinas, ZK-304709, Veglin®, VMDA-3601, EG-004, CEP-701 (documento US 5.621.100), Cand5 (documento WO 04/09769); inhibidores de tirosina cinasa Erb2 tales como pertuzumab (documento WO 01/00245), trastuzumab y rituximab; inhibidores de proteína cinasa Akt, tales como RX-0201; inhibidores de proteína cinasa C (PKC), tales como LY-317615 (documento WO 95/17182) y perifosina (documento US 2003171303); inhibidores de cinasa Raf/Map/MEK/Ras incluyendo sorafenib (BAY 43-9006), ARQ-350RP, LERafAON, BMS-354825, AMG-548, y otros dados a conocer en el documento WO 03/82272; inhibidores de cinasas receptoras de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR); inhibidores de cinasas dependientes de células (CDK), incluyendo CYC-202 o roscovitina (documentos WO 97/20842 y WO 99/02162); inhibidores de cinasas receptoras de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) tales como CHIR-258, AcM 3G3, AG-13736, SU-11248 y SU6668; e inhibidores de cinasas Bcr-Abl y proteínas de fusión tales como STI-571 o Gleevec® (imatinib).

B. Antiestrógenos: Los agentes de selección como diana de estrógenos para su uso en terapia contra el cáncer junto con el compuesto de la invención incluyen moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) incluyendo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno; inhibidores de aromataza incluyendo Arimidax® o anastrozol; reguladores por disminución de los receptores de estrógenos (ERD) incluyendo Faslodex® o fulvestrant.

C. Antiandrógenos: Los agentes de selección como diana de andrógenos para su uso en terapia contra el cáncer junto con el compuesto de la invención incluyen flutamida, bicalutamida, finasterida, aminoglutetamida, ketoconazol, y corticosteroides.

D. Otros inhibidores: Otros inhibidores para su uso como agentes anticancerígenos junto con el compuesto de la invención incluyen inhibidores de proteína farnesil transferasa incluyendo tipifarnib o R-115777 (documentos US 2003134846 y WO 97/21701), BMS-214662, AZD-3409 y FTI-277; inhibidores de topoisomerasa incluyendo merbarona y diflomotecán (BN-80915); inhibidores de proteína del huso de kinesina mitótico (KSP) incluyendo SB-743921 y MKI-833; moduladores del proteasoma tales como bortezomib o Velcade® (documento US 5.780.454), XL-784; e inhibidores de ciclooxigenasa 2 (COX-2) incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos I (AINE).

E. Fármacos quimioterápicos contra el cáncer: agentes quimioterápicos contra el cáncer particulares para su uso como agentes anticancerígenos junto con el compuesto de la invención incluyen anastrozol (Arimidax®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfano (Myleran®), inyección de busulfano (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), inyección liposomal de citarabina (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (actinomycin D, Cosmegan), clorhidrato de daunorubicina (Cerubidine®), inyección liposomal de citrato de daunorubicina (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Acrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacicitabina, gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxiurea (Hydrea®), idarubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina cálcica, melfalán (Alqueran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), milotarg, paclitaxel (Taxol®), fénix (itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosán 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), clorhidrato de topotecán para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).

F. Agentes alquilantes: Los agentes alquilantes para su uso junto con el compuesto de la invención incluyen VNP-40101M o cloretizina, oxaliplatino (documentos US 4.169.846, WO 03/24978 y WO 03/04505), glufosfamida, mafosfamida, etopofós (documento US 5.041.424), prednimustina; treosulfano; busulfano; irofluvono (acilfluvono);

penclomedina; pirazoloacridina (PD-115934); O6-bencilguanina; decitabina (5-aza-2-desoxicitidina); brostalicina; mitomicina C (MitoExtra); TLK-286 (Telcyta®); temozolomida; trabectedina (documento US 5.478.932); AP-5280 (formulación de platino de cisplatino); porfiromicina; y clearazida (mecloretamina).

5 G. Agentes quelantes: Los agentes quelantes para su uso junto con el compuesto de la invención incluyen tetratiomolibdato (documento WO 01/60814); RP-697; T84.66 quimérico (cT84.66); gadofosveset (Vasovist®); deferoxamina; y bleomicina opcionalmente en combinación con electroporación (EPT).

10 H. Modificadores de la respuesta biológica: Los modificadores de la respuesta biológica, tales como moduladores inmunitarios, para su uso junto con el compuesto de la invención incluyen estaurosporina y análogos macrocíclicos de la misma, incluyendo UCN-01, CEP-701 y midostaurina (véanse los documentos WO 02/30941, WO 97/07081, WO 89/07105, US 5.621.100, WO 93/07153, WO 01/04125, WO 02/30941, WO 93/08809, WO 94/06799, WO 00/27422, WO 96/13506 y WO 88/07045); escualamina (documento WO 01/79255); DA-9601 (documentos WO 98/04541 y US 6.025.387); alemtuzumab; interferones (por ejemplo IFN-a, IFN-b, etc.); interleucinas, específicamente IL-2 o aldesleucina así como IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, y 15 variantes biológicas activas de los mismos que tienen secuencias de aminoácidos de más del 70% de la secuencia humana nativa; altretamina (Hexalen®); SU 101 o leflunomida (documentos WO 04/06834 y US 6.331.555); imidazoquinolinas tales como resiquimod e imiquimod (documentos US 4.689.338, 5.389.640, 5.268.376, 4.929.624, 5.266.575, 5.352.784, 5.494.916, 5.482.936, 5.346.905, 5.395.937, 5.238.944 y 5.525.612); y SMIP, incluyendo benzazoles, antraquinonas, tiosemicarbazonas y triptantrinas (documentos WO 04/87153, WO 04/64759 y WO 04/60308).

20 I. Vacunas contra el cáncer: Las vacunas contra el cáncer para su uso junto con el compuesto de la invención incluyen Avicine® (Tetradion Lett. 26:2269-70 (1974)); oregovomab (OvaRex®); Theratope® (STn-KLH); vacunas contra el melanoma; serie GI-4000 (GI-4014, GI-4015, y GI-4016), que se dirigen contra cinco mutaciones en la proteína Ras; GlioVax-1; MelaVax; Advexin® o INGN-201 (documento WO 95/12660); Sig/E7/LAMP-1, que codifica para HPV-16 E7; vacuna contra MAGE-3 o M3TK (documento WO 94/05304); HER-2VAX; ACTIVE, que estimula 25 células T específicas para tumores; vacunas contra el cáncer de GM-CSF; y vacunas basadas en monocitogenes de *Listeria*.

30 J. Terapia antisentido: Los agentes anticancerígenos para su uso junto con el compuesto de la invención también incluyen composiciones antisentido, tales como AEG-35156 (GEM-640); AP-12009 y AP-11014 (oligonucleótidos antisentido específicos para TGF-beta2); AVI-4126; AVI-4557; AVI-4472; oblimersen (Genasense®); JFS2; aprinocarseno (documento WO 97/29780); GTI-2040 (oligonucleótidos antisentido de ARNm de ribonucleótido reductasa R2) (documento WO 98/05769); GTI-2501 (documento WO 98/05769); oligodesoxinucleótidos antisentido c-Raf encapsulados en liposomas (LErafAON) (documento WO 98/43095); y Sirna-027 (producto terapéutico basado en iARN que selecciona como diana ARNm de VEGFR-1).

35 El compuesto también puede combinarse en una composición farmacéutica con sustancias farmacológicas broncodilatadoras o antihistamínicas. Tales fármacos broncodilatadores incluyen agentes anticolinérgicos o antimuscarínicos, en particular bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio y bromuro de tiotropio, y agonistas de receptores β -2-adrenérgicos tales como salbutamol, terbutalina, salmeterol, carmoterol, milveterol y, especialmente, formoterol o indacaterol. Las sustancias farmacológicas antihistamínicas coterapéuticas incluyen clorhidrato de cetirizina, fumarato de clemastina, prometazina, loratadina, desloratadina-difenhidramina y clorhidrato de fexofenadina. 40

También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y uno o más compuestos que son útiles para el tratamiento de una enfermedad trombotica, enfermedad cardiaca, accidente cerebrovascular, etc. Tales compuestos incluyen aspirina, una estreptocinasa, un activador del plasminógeno tisular, una urocinasa, un anticoagulante, fármacos antiplaquetarios (por ejemplo, PLAVIX; bisulfato de clopidogrel), una estatina (por ejemplo, LIPITOR o atorvastatina cálcica), ZOCOR (simvastatina), CRESTOR (rosuvastatina), etc.), un beta-bloqueante (por ejemplo, atenolol), NORVASC (besilato de amlodipino) y un inhibidor de ACE (por ejemplo, lisinopril). 45

También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y uno o más compuestos que son útiles para el tratamiento de antihipertensión. Tales compuestos incluyen inhibidores de ACE, agentes 50 hipolipemiantes tales como estatinas, LIPITOR (atorvastatina cálcica), bloqueantes de los canales de calcio tales como NORVASC (besilato de amlodipino).

También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en fibratos, beta-bloquetantes, inhibidores de NEPI, antagonistas del receptor de angiotensina-2 e inhibidores de la agregación plaquetaria.

55 También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y un compuesto adecuados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo artritis reumatoide. Tal compuesto puede seleccionarse del

5 grupo que consiste en inhibidores de TNF- α tales como anticuerpos monoclonales anti-TNF- α (tales como REMICADE, CDP-870) y D2E7 (HUMIRA) y moléculas de fusión de inmunoglobulina-receptor de TNF (tales como ENBREL), inhibidores de IL-1, antagonistas de receptor o IL-1R α soluble (por ejemplo inhibidores de ICE o KINERET), agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE), piroxicam, diclofenaco, naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, ibuprofeno, fenamatos, ácido mefenámico, indometacina, sulindaco, apazona, pirazolonas, fenilbutazona, aspirina, inhibidores de COX-2 (tal como CELEBREX (celecoxib), PREXIGE (lumiracoxib)), inhibidores de metaloproteasa (preferiblemente inhibidores selectivos de MMP-13), inhibidores de p2x7, inhibidores de α 2 α , NEUROTIN, pregabalina, metotrexato a dosis baja, leflunomida, hidroxicloroquina, d-penicilamina, auranofina u oro parenteral u oral.

10 También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y un compuesto adecuados para el tratamiento de osteoartritis. Tal compuesto puede seleccionarse del grupo que consiste en agentes antiinflamatorios no esteroideos convencionales (a continuación en el presente documento AINE) tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiónicos tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno e ibuprofeno, fenamatos tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindaco, apazona, pirazolonas tales como fenilbutazona, salicilatos tales como aspirina, inhibidores de COX-2 tales como celecoxib, valdecoxib, lumiracoxib y etoricoxib, analgésicos y terapias intraarticulares tales como corticosteroides y ácidos hialurónicos tales como Hyalgan y Synvisc.

También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y un agente antiviral y/o un compuesto antisepsia. Tal agente antiviral puede seleccionarse del grupo que consiste en Viracept, AZT, aciclovir y famciclovir. Tal compuesto antisepsia puede seleccionarse del grupo que consiste en Valant.

20 También puede proporcionarse una combinación que comprende el compuesto y uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste en agentes para el SNC tales como antidepresivos (sertralina), fármacos antiparkinsonianos (tales como deprenilo, Ldopa, Requip, Mirapex; inhibidores de MAOB (tales como selegina y rasagilina); inhibidores de comP (tales como Tasmara); inhibidores de A-2; inhibidores de la recaptación de dopamina; antagonistas de NMDA; agonistas de nicotina; agonistas de dopamina; e inhibidores de ácido nítrico sintasa neuronal).

25 También puede proporcionarse una combinación que comprende un compuesto de la invención y uno o más fármacos contra el Alzheimer. Tal fármaco contra el Alzheimer puede seleccionarse del grupo que consiste en donepezilo, tacrina, inhibidores de α 2 δ , NEUROTIN, pregabalina, inhibidores de COX-2, propentofina o metrifonato.

30 También puede proporcionarse una combinación que comprende un compuesto de la invención y agentes contra la osteoporosis y/o un agente inmunosupresor. Tales agentes contra la osteoporosis pueden seleccionarse del grupo que consiste en EVISTA (clorhidrato de raloxifeno), droloxifeno, lasofoxifeno o fosomax. Tales agentes inmunosupresores pueden seleccionarse del grupo que consiste en FK-506 y rapamicina.

35 También pueden proporcionarse kits que incluyen el compuesto la invención y una pareja de combinación tal como se da a conocer en el presente documento. Los kits representativos incluyen un compuesto inhibidor de PI3K (por ejemplo, el compuesto de la invención) y un folleto u otro etiquetado que incluye instrucciones para tratar una enfermedad proliferativa celular mediante la administración de una cantidad inhibidora de PI3K del compuesto.

40 En general, el compuesto de la invención se administrará en una cantidad terapéuticamente eficaz mediante cualquiera de los modos de administración aceptados para agentes que sirven para utilidades similares. La cantidad real del compuesto de la invención, es decir, el principio activo, dependerá de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad que va a tratarse, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado, la vía y forma de administración, y otros factores. El fármaco puede administrarse más de una vez al día, preferiblemente una o dos veces al día. Todos estos factores están dentro de los conocimientos del médico encargado. Las cantidades terapéuticamente eficaces de compuestos de fórmulas I pueden oscilar entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del receptor al día; preferiblemente de aproximadamente 0,1-25 mg/kg/día, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5 y 45 10 mg/kg/día. Por tanto, para la administración a una persona de 70 kg, el intervalo de dosificación será lo más preferiblemente de aproximadamente 35-70 mg al día.

50 En general, el compuesto de la invención se administrará como composiciones farmacéuticas por una cualquiera de las siguientes vías: administración oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o mediante supositorio) o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea). El modo de administración preferido es el oral usando un régimen de dosificación diaria conveniente que puede ajustarse según el grado de afectación. Las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos, pastillas, cápsulas, productos semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, disoluciones, suspensiones, elixires, aerosoles, o cualquier otra composición apropiada. Otro modo preferido para administrar el compuesto de la invención es mediante inhalación. Esto es un método eficaz para administrar un agente terapéutico directamente a las vías respiratorias.

55 La elección de la formulación depende de diversos factores tales como el modo de administración del fármaco y la

biodisponibilidad de la sustancia farmacológica. Para la administración mediante inhalación, el compuesto puede formularse como disolución líquida, suspensiones, propelentes de aerosol o polvo seco y cargarse en un dispensador adecuado para la administración. Existen varios tipos de dispositivos de inhalación farmacéutica-
 5 inhaladores de nebulizador, inhaladores de dosis medida (MDI) e inhaladores de polvo seco (DPI). Los dispositivos de nebulizador producen una corriente de aire a alta velocidad que provoca que los agentes terapéuticos (que se formulan en forma líquida) se pulvericen como una neblina que se lleva al interior de las vías respiratorias del paciente. Los MDI normalmente son una formulación envasada con un gas comprimido. Tras su accionamiento, el dispositivo descarga una cantidad medida de agente terapéutico mediante el gas comprimido, proporcionando por
 10 tanto un método fiable de administración de una cantidad establecida de agente. DPI dispensa agentes terapéuticos en forma de un polvo de flujo libre que puede dispersarse en la corriente de aire de inspiración del paciente durante la respiración mediante el dispositivo. Para lograr un polvo de flujo libre, el agente terapéutico se formula con un excipiente tal como lactosa. Se almacena una cantidad medida del agente terapéutico en forma de cápsula y se dispensa con cada accionamiento.

La invención también se refiere a formulaciones en las que el tamaño de partícula de un compuesto de fórmula (I) es de entre 10 - 1000 nm, preferiblemente 10 - 400 nm. Tales formulaciones farmacéuticas se han desarrollado especialmente para fármacos que presentan escasa biodisponibilidad basándose en el principio de que puede aumentarse la biodisponibilidad mediante el aumento del área superficial, es decir, la disminución del tamaño de partícula. Por ejemplo, el documento U.S. 4.107.288 describe una formulación farmacéutica que tiene partículas en el intervalo de tamaño de desde 10 hasta 1.000 nm en la que el material activo está soportado sobre una matriz
 15 reticulada de macromoléculas. El documento U.S. 5.145.684 describe la producción de una formulación farmacéutica en la que se pulveriza la sustancia farmacológica a nanopartículas (tamaño de partícula promedio de 400 nm) en presencia de un modificador de superficie y luego se dispersan en un medio líquido para dar una formulación farmacéutica que presenta una biodisponibilidad notablemente alta. Ambos documentos se incluyen como referencia.

En un aspecto adicional, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden (una cantidad terapéuticamente eficaz de) un compuesto de la invención, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Excipientes aceptables son no tóxicos, ayudan a la administración y no afectan adversamente al beneficio terapéutico del compuesto de la invención. Tal excipiente puede ser cualquier excipiente sólido, líquido, semisólido o, en el caso de una composición de aerosol, gaseoso que está disponible en general para un experto en la técnica.

Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo y similares.

Pueden seleccionarse excipientes líquidos y semisólidos de glicerol, propilenglicol, agua, etanol y diversos aceites, incluyendo los del origen del petróleo, animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc. Los portadores líquidos preferidos, particularmente para disoluciones inyectables, incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles.

Pueden usarse gases comprimidos para dispersar un compuesto de la invención en forma de aerosol. Gases inertes adecuados para este fin son nitrógeno, dióxido de carbono, etc. Otros excipientes farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, editado por E. W. Martin (Mack Publishing Company, 18ª ed., 1990). La cantidad del compuesto en una formulación puede variar dentro del intervalo completo empleado por los expertos en la técnica. Normalmente, la formulación contendrá, en una base de porcentaje en peso (% en peso), desde aproximadamente el 0,01-99,99% en peso de un compuesto de la invención basándose en la formulación total, siendo el resto uno o más excipientes farmacéuticos adecuados. Preferiblemente, el compuesto está presente a un nivel de aproximadamente el 1-80% en peso.

La invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden (es decir que contienen o que consisten en) al menos un compuesto de la invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con al menos un excipiente farmacéutico aceptable (tal como un portador y/o diluyente) de manera convencional mediante el mezclado de los componentes.

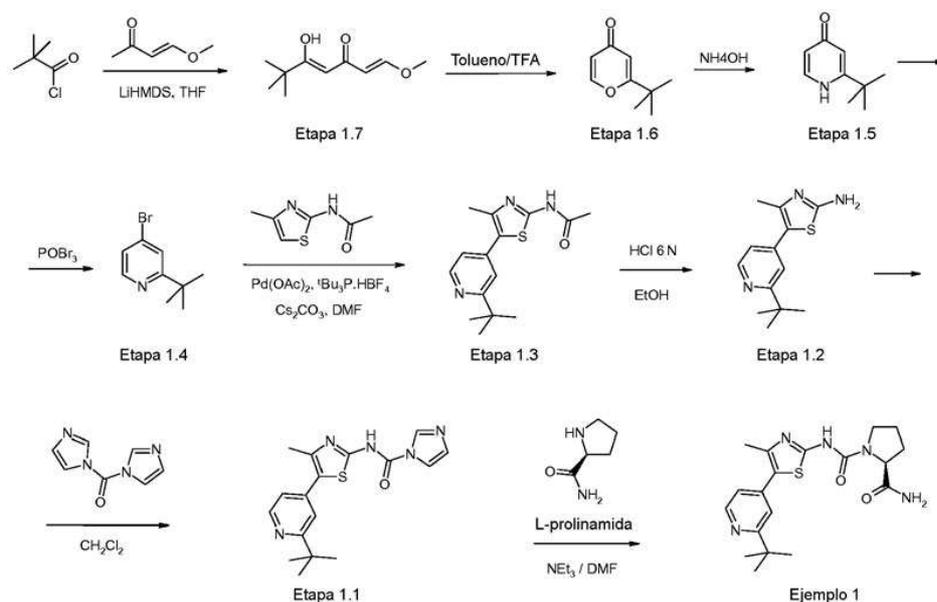
Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas combinadas que comprenden un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable y que comprenden además una pareja de combinación (o bien en una forma unitaria de dosificación o bien como un kit de partes) en asociación con al menos un portador y/o diluyente farmacéutico aceptable de manera convencional mediante el mezclado con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable con dichos principios activos.

Por consiguiente, la invención proporciona en aspectos adicionales

- 5 ▪ una composición farmacéutica combinada, por ejemplo para su uso en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, que comprende un compuesto de la invención en forma libre o forma de sal farmacéuticamente aceptable en asociación con un diluyente y/o portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 ▪ una composición farmacéutica combinada que comprende un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable como principio activo; uno o más materiales portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables y opcionalmente una o más sustancias farmacológicas adicionales. Tal composición farmacéutica combinada puede estar en forma de una forma unitaria de dosificación o como kit de partes.
- 15 ▪ una composición farmacéutica combinada que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable y una segunda sustancia farmacológica, para administración simultánea o secuencial.
- un compuesto de la invención para su uso en un método, según se definió anteriormente, que comprende coadministrar, por ejemplo de manera concomitante o en secuencia, una cantidad terapéuticamente eficaz, no tóxica de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos una segunda sustancia farmacológica, por ejemplo tal como se indicó anteriormente.
- una combinación farmacéutica, por ejemplo un kit, que comprende a) un primer agente que es un compuesto de la invención tal como se da a conocer en el presente documento, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, y b) al menos un coagente, por ejemplo tal como se indicó anteriormente; mediante lo cual tal kit puede comprender instrucciones para su administración.

20 Los siguientes ejemplos ilustran la invención. Se proporciona el ejemplo 1 para fines de referencia. A continuación en el presente documento se describen métodos para preparar tales compuestos.

Ejemplo 1: 2-Amida y 1-[[5-(2-terc-butil-piridin-4-il)-4-metil-tiazol-2-il]-amida] del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico

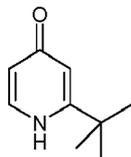


25 Se añade Et₃N (1,54 ml, 11,1 mmol, 3 eq) a una disolución de [5-(2-terc-butil-piridin-4-il)-4-metil-tiazol-2-il]-amida del ácido imidazol-1-carboxílico (etapa 1.1) (1,26 g, 3,7 mmol) y L-prolinamida (0,548 g, 4,8 mmol, 1,3 eq) en DMF (25 ml), bajo una atmósfera de argón. Se agita la mezcla de reacción durante 14 h a ta, se extingue mediante adición de una disolución saturada de NaHCO₃, y se extrae con EtOAc. Se lava la fase orgánica con una disolución saturada de NaHCO₃, se seca (Na₂SO₄), se filtra y se concentra. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH, 1:0 → 94:6), seguido por trituración en Et₂O para proporcionar 1,22 g del compuesto del título como un sólido blanquecino: ESI-EM: 388,1 [M+H]⁺; t_R = 2,35 min (sistema 1); CCF: R_f = 0,36 (DCM/MeOH, 9:1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 1,32 (s, 9 H) 1,75-1,95 (m, 3 H) 1,97 - 2,13 (m, 1 H) 2,39 (s, 3 H) 3,38-3,50 (m, 1 H) 3,52-3,65 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,94 (s. a., 1 H) 7,22 (d, 1 H) 7,30 - 7,48 (m, 2 H) 8,49 (d, 1 H) 10,87 (s. a., 1 H).

30

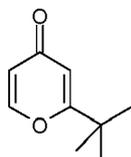
gel de sílice (Hex/EtOAc, 95:5) para proporcionar 5,18 g del compuesto del título como un aceite amarillo: ESI-EM: 214,0 / 216,0 $[M+H]^+$; $t_R = 2,49$ min (sistema 1); CCF: $R_f = 0,35$ (Hex/EtOAc, 1:1).

Etapa 1.5: 2-terc-Butil-1H-piridin-4-ona



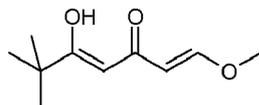
- 5 Se agita una mezcla de 2-terc-butil-piran-4-ona (etapa 1.6) (5,74 g, 37,7 mmol) y una disolución acuosa al 30% de hidróxido de amonio (100 ml) durante 1 h a reflujo, se deja enfriar y se concentra. Se tritura el residuo con MeOH (200 ml) y se filtra. Se concentra el filtrado y se purifica el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM/MeOH/NH₃ ac., 94:5:1 → 92:7:1) para proporcionar 4,46 g del compuesto del título como un sólido amarillo: ESI-EM: 152,0 $[M+H]^+$; $t_R = 1,45$ min (sistema 1); CCF: $R_f = 0,11$ (DCM/MeOH, 9:1).

10 Etapa 1.6: 2-terc-Butil-piran-4-ona



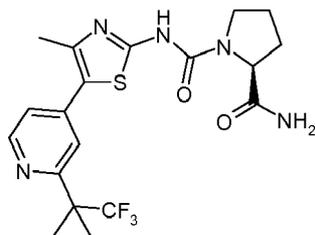
- 15 Se agita una mezcla de 5-hidroxi-1-metoxi-6,6-dimetil-hepta-1,4-dien-3-ona (etapa 1.7) (6,8 g, 36,9 mmol) y TFA (5,65 ml, 74 mmol, 2 eq) en benceno (250 ml) durante 14 h a ta y se concentra. La purificación del residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (Hex/EtOAc, 1:0 → 75:25) proporciona 5,74 g del compuesto del título como un aceite amarillo: ESI-EM: 153,1 $[M+H]^+$; $t_R = 3,21$ min (sistema 1); CCF: $R_f = 0,22$ (Hex/EtOAc, 1:1).

Etapa 1.7: 5-Hidroxi-1-metoxi-6,6-dimetil-hepta-1,4-dien-3-ona



- 20 Se añade LiHMDS (1 M en THF, 100 ml, 2 eq) gota a gota a una disolución fría (-78°C) de 4-metoxi-3-buten-2-ona (10 ml, 100 mmol, 2 eq) en THF (400 ml). Tras agitación durante 30 min a -78°C, se añade una disolución de cloruro de pivaloilo (6,12 ml, 50 mmol) en THF (100 ml). Se deja calentar la mezcla resultante hasta ta a lo largo de 2 h y se extingue mediante adición de una disolución saturada de NH₄Cl. Se elimina el THF a vacío. Se extrae la mezcla concentrada con Et₂O. Se lava la fase orgánica con salmuera, se seca (Na₂SO₄), se filtra y se concentra. Se purifica el residuo mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (Hex/EtOAc, 1:0 → 85:15) para proporcionar 6,83 g del compuesto del título como un aceite amarillo: ESI-EM: 185,1 $[M+H]^+$; CCF: $R_f = 0,87$ (Hex/EtOAc, 1:1).

- 25 **Ejemplo 15: 2-Amida y 1-((4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetil-etil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il)-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico**



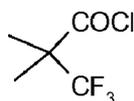
- 30 Se prepara el compuesto del título de manera análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 1 pero con las siguientes modificaciones. En la etapa 1.1, se agita la mezcla de reacción durante 14 h a reflujo. En la etapa 1.2, se agita la mezcla de reacción durante 1 h a 85°C y se extrae con EtOAc tras haberse extinguido. En la etapa 1.3, se agita la mezcla de reacción durante 2,5 h a 120°C. En la etapa 1.4, se agita la mezcla de reacción durante 1 h a 83°C y se extrae con EtOAc tras haberse extinguido. En la etapa 1.5, se agita la mezcla de reacción durante 1 h a

65°C y no se realiza la trituración en MeOH. En la etapa 1.6, no se purifica el producto bruto. En la etapa 1.7, se usa cloruro de 3,3,3-trifluoro-2,2-dimetil-propionilo (etapa 12.1).

5 Compuesto del título: ESI-EM: 442,0 [M+H]⁺; t_R = 3,02 min (sistema 1); CCF: R_f = 0,35 (DCM/MeOH, 9:1). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1,60 (s, 6 H) 1,70-1,95 (m, 3 H) 1,99 - 2,16 (m, 1 H) 2,40 (s, 3 H) 3,38 - 3,51 (m, 1 H) 3,51 - 3,69 (m, 1 H) 4,10-4,40 (m, 1 H) 6,95 (s. a., 1 H) 7,39 (d, 2 H) 7,53 (s, 1 H) 8,58 (d, 1 H) 10,93 (s. a., 1 H).

10 En un procedimiento alternativo se prepara el compuesto del título de manera análoga al procedimiento descrito en el ejemplo 1 pero con las siguientes modificaciones: se usa N,N-dimetilacetamida en lugar de DMF y se agita la mezcla a 65°C durante 2 h. En la etapa 1.1, se usa cloroformiato de fenilo (añadido lentamente) en lugar de 1,1'-carbonildiimidazol y se lleva a cabo la reacción en THF en presencia de N,N-dietil-isopropilamina a temperatura ambiente (1,5 h). En la etapa 1.2, se calienta la mezcla de reacción con agitación durante 5 h a reflujo y se extrae con EtOAc tras haberse extinguido. En la etapa 1.3, se agita la mezcla de reacción durante 2 h a 100°C. En la etapa 1.4, se realiza la reacción en tolueno usando 1,1 equivalentes de POBr₃ y 1,1 equivalentes de tripropilamina y se agita la mezcla durante 2 h a 80°C y se extrae con EtOAc tras haberse extinguido. En la etapa 1.5, se agita la mezcla de reacción durante 1 h a 65°C y no se realiza la trituración en MeOH. En la etapa 1.6, se usa tolueno en lugar de benceno y no se purifica el producto bruto. En la etapa 1.7, se usa cloruro de 3,3,3-trifluoro-2,2-dimetil-propionilo (etapa 12.1).

Etapa 12.1: Cloruro de 3,3,3-trifluoro-2,2-dimetil-propionilo



20 Se prepara el compuesto del título de manera análoga al procedimiento descrito en la etapa 5.1 pero usando ácido 3,3,3-trifluoro-2,2-dimetil-propiónico.

Etapa 5.1: Cloruro de 1-metil-ciclopropanocarbonilo



25 Se agita una mezcla de ácido 1-metil-ciclopropanocarboxílico (10 g, 100 mmol) y cloruro de oxalilo (10,49 ml, 120 mmol, 1,2 eq) en CHCl₃ (80 ml) durante 4 h a 70°C. Se concentra la mezcla de reacción para proporcionar 11,8 g del compuesto del título como un aceite amarillo que se usa sin purificación adicional.

Condiciones de HPLC analítica:

Gradiente lineal del 20-100% de disolvente A en 5 min + 1,5 min con el 100% de disolvente A; detección a 215 nm, velocidad de flujo de 1 ml/min a 30°C. Columna: Nucleosil 100-3 C18 (70 x 4,0 mm). Disolvente A = CH₃CN + TFA al 0,1%; disolvente B = H₂O + TFA al 0,1%.

30 Condiciones de EM:

Instrumento: Micromass Platform II, eluyente: metanol al 15% en agua que contiene el 0,2% de una disolución de hidróxido de amonio al 25%.

Espectros de ¹H-RMN: se midieron en un espectrómetro Varian Mercury 400 en los disolventes indicados. Abreviaturas: a: ancho; s: singlete; d: doblete; t: triplete; q: cuartete; ppm: parte por millón

35 Condiciones de HPLC/EM:

Instrumento: Hewlett Packard Agilent serie 1100, columna: XBridge™ C18 2,5 micrómetros, 3,0 X 30 mm, temperatura: 50°C, eluyente: sistema de 2 canales: canal A con acetonitrilo al 5% en agua, canal B con acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 1,0%.

Tiempo (minutos)	% de canal B	Flujo (ml/minuto)
0	5	1,4
3,7	95	1,4
4,4	95	2,4

ES 2 560 673 T3

Tiempo (minutos)	% de canal B	Flujo (ml/minuto)
4,45	95	2,4

Detección: Agilent 1100 DAD a 210-350 nm y Waters Micromass ZQ 2000 con ESI+ y ESI-.

HPLC preparativa:

5 Instrumento: Sistema de HPLC preparativa de Gilson, columna: Sunfire™ Prep C18 OBD™ 5 micrómetros, 30 X 100 mm, temperatura: 25°C, eluyente: gradiente de desde el 5 - 100% de acetonitrilo en ácido trifluoroacético acuoso al 0,05% a lo largo de 20 minutos, velocidad de flujo: 30 ml/minuto, detección: UV 254 nm.

Abreviaturas y acrónimos:

BBr ₃	tribromuro de boro
tBuP.HBF ₄	tetrafluoroborato de tri-terc-butilfosfinio
DCM	diclorometano
DIEA	diisopropiletilamina
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
DME	1,2-dimetoxietano
DMF	dimetilformamida
DMP	1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1H)-pirimidinona
DMSO	dimetilsulfóxido
Hex	hexano
l	litro(s)
LiHMDS	bis(trimetilsilil)amiduro de litio
p.f.	punto de fusión
MPLC	cromatografía de líquidos de media presión
NBS	N-bromosuccinimida
NMP	1-metil-2-pirrolidona
PdCl ₂ (dppf)	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio (II)
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(trifenilfosfina)paldio (0)
R _f	factor de retención (CCF)
ta	temperatura ambiente
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
CCF	cromatografía en capa fina
t _R	tiempo de retención
v	volumen
p	peso

Ejemplo A: eficacia como inhibidores de PI3 cinasas

- 10 Ensayo de PI3K KinaseGlo: se dispensaron 50 nl de diluciones de compuestos sobre placas negras de 384 pocillos, de pequeño volumen, de estireno antiadherente (NBS) (Costar, n.º de cat. NBS#3676). Se transfirió L-a-fosfatidilinositol (PI), proporcionado como disolución 10 mg/ml en metanol, al interior de un tubo de vidrio y se secó bajo una corriente de nitrógeno. Después se resuspendió en octilglucósido (OG) al 3% mediante agitación con vórtex y se almacenó a 4°C. El ensayo de cinasa luminiscente KinaseGlo (Promega, Madison/WI, EE.UU.) es un método de HTS homogéneo de medición de la actividad cinasa mediante cuantificación de la cantidad de ATP que queda en disolución tras una reacción con cinasa.
- 15 Se añadieron 5 µl de una mezcla de PI/OG con el subtipo PI3K (tabla 1). Se iniciaron reacciones con cinasa mediante adición de 5 µl de una mezcla de ATP que contenía en un volumen final 10 µl de TRIS-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 3 mM, NaCl 50 mM, CHAPS al 0,05%, DTT 1 mM y ATP 1 µM, y se produjo a temperatura ambiente. Se detuvieron las reacciones con 10 µl de KinaseGlo y se leyeron las placas 10 min después en un lector Synergy2 usando un tiempo de integración de 0,1 segundos por pocillo. Se añadieron 2,5 µM de un pan-inhibidor de PI3
- 20 cinasa de clase 1 (patrón) a las placas de ensayo para generar el 100% de inhibición de la reacción con cinasa, y se facilitó el 0% de inhibición mediante el vehículo de disolvente (DMSO al 90% en agua). Se usó el patrón como compuesto de referencia y se incluyó en todas las placas de ensayo en forma de 16 puntos de dilución por duplicado.

Tabla 1 PI3K mediante KinaseGlo: condiciones de ensayo y protocolo de reactivos

Vol (10 ml)	Enzima (nM)	ATP (μM)	PI/OG (μM/μg/ml)	NaCl (mM)	Mg ²⁺ (mM)	CHAPS (%)	DTT (mM)	tiempo (min)
PI3K α	10	1	11/10	50	3	0,05	1	30
PI3K β	25	1	11/10	50	3	0,05	1	30
PI3K γ	150	1	22/20	50	3	0,05	1	90
PI3K δ	10	1	11/10	50	3	0,05	1	30

Clonación de las PI3K

Los constructos de PI3K α , PI3K β y PI3K δ son fusiones del dominio iSH2 de p85 α y las respectivas isoformas de p110. Se generaron los genes de isoforma de p110 y el fragmento p85 α mediante PCR a partir de ADNc de primera hebra generado mediante RT-PCR a partir de ARN comercial de placenta, testículos y cerebro tal como se describe a continuación. Se obtuvo el constructo de PI3K γ de Roger Williams lab, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, R.U. (noviembre de 2003) y se describe (Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. Cell (2000), 103(6), 931-943).

Proteínas y constructos de PI3K α

PI3K α de tipo natural	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGG-p110 α (21-1068)-His
-------------------------------	--------	--

BV1075: Se generó el constructo para baculovirus BV-1075 mediante un ligamiento en tres partes que se compone de un fragmento p85 y un fragmento p110 α clonados en un vector pBlueBac4.5. Se derivó el fragmento p85 del plásmido p1661-2 digerido con Nhe/Spe. Se verificó mediante secuenciación el fragmento p110 α derivado de un clon y se usó en un LR410 como fragmento de SpeI/HindIII. Para la generación del vector de expresión en baculovirus LR410, se usó la reacción de Gateway LR para transferir el inserto al vector pBlueBac4.5 adaptado para Gateway (Invitrogen). Se digirió el vector de clonación pBlueBac4.5 (Invitrogen) con Nhe/HindIII. Esto dio como resultado el constructo PED 153.8. Se generó el componente de p85 (iSH2) mediante PCR usando ORF 318 (descrito anteriormente) como molde y un cebador directo KAC1028 (5'-GCTAGCATGCGAGAATATGATAGAT-TATATGAAG-AATATAACC) (SEQ ID NO: 1) y dos cebadores inversos, KAC1029 (5'-GCCTCCACCAC-CTCCGCCTG-GTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC) (SEQ ID NO: 2) y KAC1039 (5'-TACTAGTC-CGCCTCCAC-CACCTCCGCCTCCACCACCTCCGCC) (SEQ ID NO: 3). Los dos cebadores inversos se solapan e incorporan el ligador 12x Gly y la secuencia N-terminal del gen de p110 α al sitio SpeI. El ligador 12x Gly sustituye al ligador de una única Gly en el constructo BV1052. Se clonó el fragmento de PCR en pCR2.1 TOPO (Invitrogen). De los clones resultantes, se determinó que p1661-2 era correcto mediante secuenciación. Se digirió este plásmido con Nhe y SpeI y se aisló en gel el fragmento resultante y se purificó mediante subclonación.

Se generó el fragmento de clonación de p110 α mediante digestión enzimática del clon LR410 (véase anteriormente) con SpeI e HindIII. El sitio SpeI está en la región codificante del gen de p110 α . Se aisló en gel el fragmento resultante y se purificó para subclonación. Se preparó el vector de clonación, pBlueBac4.5 (Invitrogen), mediante digestión enzimática con Nhe e HindIII. Se purificó el vector de corte con columna Qiagen y después se desfosforiló con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) (BioLabs). Tras completarse la reacción con CIP, volvió a purificarse en columna el vector de corte para generar el vector final. Se realizó un ligamiento en tres partes usando ligasa rápida de Roche y las especificaciones del proveedor. Se verificó el plásmido final mediante secuenciación.

Dominio de cinasa.

Secuencia de proteína de BV 1075:

ES 2 560 673 T3

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGGGGGG
121 GLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFFDETRRL CDLRLFQPFLL KVIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNINLVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESPELKP HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIRKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQ GK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLPR ARLCLSICSV KGRKGAKKEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNRSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLK KALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLEEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNEEI
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNQGL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKFKGYKR ERVPFVLTQD FLIVISKGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSMMLGSG MPQLQSFDI AYIRKTLALD KTEQEALEYF
1141 MKQMNDAAHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 4)

```

Proteínas y constructos de PI3Kβ

PI3Kβ	BV949	p85iSH2(461-N58K-568)-GGGGGG-p110β(2-1070)-His
-------	-------	--

5 BV949: Se generaron productos de PCR para el dominio entre SH2 (iSH2) de la subunidad PI3Kα, PI3Kβ y PI3Kδ de p85 y para la subunidad p110β de longitud completa y se fusionaron mediante PCR solapante. Se obtuvo el producto de PCR de iSH2 a partir de ADNc de primera hebra generado mediante RT-PCR a partir de ARN humano comercial de placenta, testículos y cerebro (Clontech), usando inicialmente los cebadores gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 5) y gwG130-p02 (5'-TGGTTT-AATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 6). Posteriormente, en una reacción de PCR secundaria, se añadieron sitios AttB1 de recombinación de Gateway y secuencias de ligador en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento iSH2 de p85 respectivamente, usando los cebadores gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTT-TGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 7) y gwG130-p05 (5'-ACTGAAGCATCCTCCTC-CTCCTCCT-CCTGGTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC-3') (SEQ ID NO: 8). Se obtuvo el fragmento p110β mediante PCR usando como molde un clon de p110β (de fuente desconocida cuya secuencia se verificó) usando los cebadores gwG130-p04 (5'-ATTAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGCTT-CAGTTTCATAATGCCTCCTGCT-3') (SEQ ID NO: 9) que contiene secuencias de ligador y el extremo 5' de p110β y gwG130-p06 (5'-AGTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCAGATC-TGTAGTCTTCCGAA-CTGTGTG-3') (SEQ ID NO: 10) que contiene secuencias del extremo 3' de p110-β fusionadas con una cola de histidina. Se ensambló la proteína de fusión p85-iSH2/p110β mediante una reacción de PCR solapante de los ligadores en el extremo 3' del fragmento iSH2 y el extremo 5' del fragmento p110β, usando el cebador gwG130-p03 anteriormente mencionado y un cebador que contenía una cola de histidina solapante y las secuencias de recombinación de AttB2 (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 11). Se recombinó este producto final en una reacción de Gateway (Invitrogen) OR en el vector donador pDONR201 (Invitrogen) para generar el clon de entrada ORF253. Se verificó este clon mediante secuenciación y se usó en una reacción de Gateway LR (Invitrogen) para transferir el inserto al vector pBlueBac4.5 adaptado para Gateway (Invitrogen) para la generación del vector de expresión en baculovirus LR280. Este LR280 tiene una mutación de aminoácido en la secuencia de p85.

Dominio de cinasa.

Secuencia de proteína de BV949:

ES 2 560 673 T3

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGKEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRRISEII DSRRRLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGGCFSFI
121 MPPAMADILD IWAVDSQIAS DGSIPVDFLL PTGIYIQLEV PREATISYIK QMLWKQVHNY
181 PMFNLLMDID SYMFACVNQT AVYEELEDET RRLCDVRPFL PVLKLVTRSC DPGEKLDISKI
241 GVLIGKGLHE FDSLKDPEVN EFRRKMRKFS EEKILSLVGL SWMDWLKQTY PPEHEPSIPE
301 NLEDKLYGGK LIVAVHFENC QDVFSFQVSP NMNPIKVNEL AIQKRLTIHG KEDEVSPYDY
361 VLQVSGRVEY VFGDHPHIQF QYIRNCVMNR ALPHFILVEC CKIKKMYEQE MIAIEAAINR
421 NSSNLPLPLP PPKTRIISHV WENNNPFQIV LVKGNKLNTE ETVKVHVRAG LFHGTELLCK
481 TIVSSEVSGK NDHIWNEPLE FDINICDLPR MARLCFAVYA VLDKVKTKKS TKTINPSKYQ
541 TIRKAGKVHY PVAVVNTMVF DFKGQLRTGD IILHSWSSFP DELEEMLNPM GTVQTNPYTE
601 NATALHVKFP ENKKQPYYP PFDKIIEKAA EIASSDSANV SSRGGKKFLP VLKEILDRDP

661 LSQLCENEMD LIWTLRQDCR EIFPQSLPKL LLSIKWNKLE DVAQLQALLQ IWPKLPPREA
721 LELLDFNYPD QYVREYAVGC LRQMSDEELS QYLLQLVQVL KYEPFLDCAL SRFLLERALG
781 NRRIGQFLFW HLRSEVHIPA VSVQFGVILE AYCRGSVGHM KVLKQVEAL NKLKTLNSLI
841 KLNVAKLNRA KGKEAMHTCL KQSAYREALS DLQSPLNPCV ILSELYVEKC KYMDSKMKPL
901 WLVIYNNKVFV EDSVGVIFKN GDDLRLQDMLT LQMLRLMDLL WKEAGLDRM LPYGCATGD
961 RSLGIEVST SETIADIQLN SSNVAAAAAF NKDALLNWLK EYNSGDDLDR AIEEFTLSCA
1021 GYCVASYVLG IGDHSDNIM VKKTGQLFHI DFGHILGNFK SKFGIKRERV PFILTYDFIH
1081 VIQQGKTGNT EKFGFRQCC EDAYLILRRH GNLFITLFAL MLTAGLPELT SVKDIQYLKD
1141 SLALGSEEE ALKQFKQKFD EALRESWTTK VNWMHTVRK DYRSGAHHHH HHGA

```

(SEQ ID NO: 12)

Dominio de cinasa.

Proteína y constructo de PI3K γ

PI3K γ	BV950	p110 γ (Δ 143-[Met144-1102])-His
---------------	-------	---

5 Constructo obtenido de Roger Williams lab, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, R.U. (noviembre de 2003). Descripción del constructo en (Pacold, Michael E.; Suire, Sabine; Perisic, Olga; Lara-Gonzalez, Samuel; Davis, Colin T.; Walker, Edward H.; Hawkins, Phillip T.; Stephens, Len; Eccleston, John F.; Williams, Roger L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* (2000), 103(6), 931-943). Constructos que carecen de los 144 aa N-terminales.

10 Secuencia de proteína de BV950:

ES 2 560 673 T3

```

1 MSEESQAFQR QLTALIGYDV TDVSNVHDE LEFTRRGLVT PRMAEVASRD PKLYAMHPWV
61 TSKPLPEYLW KKIANNCFI VIHRSTTSQT IKVSPDDTPG AILQSFFTKM AKKSLMDIP
121 ESQSEQDFVL RVCGRDEYLV GETPIKNFQW VRHCLKNGEE IHVVLDTPPD PALDEVKKEE
181 WPLVDDCTGV TGYHEQLTIH GKDHEVFTV SLWDCDRKFR VKIRGIDIPV LPRNTDLTVF
241 VEANIQHGGQ VLCQRRTSPK PFTEEVLWNV WLEFSIKIKD LPKGALLNLQ IYCGKAPALS
301 SKASAESPSS ESKGKVRLLY YVNLILLIDHR FLRRRGEYVL HMWQISGKGE DQGSFNADKL
361 TSATNPDKEN SMSISILLDN YCHPIALPKH QPTPDPEGDR VRAEMPNQLR KQLEAIATD
421 PLNPLTAEDK ELLWHFRYES LKHPKAYPKL FSSVKWQQE IVAKTYQLLA RREVWDQSAL
481 DVGLTMQLLD CNFSDENVRA IAVQKLESLD DDDVLHYLLQ LVQAVKFEPY HDSALARFLL
541 KRGLRNKRIG HFLFWFLRSE IAQSRHYQQR FAVILEAYLR GCGTAMLHDF TQQVQVIEML
601 QKVTLDIKSL SAEKYDVSSQ VISQLKQKLE NLQNSQLPES FRVPYDPLK AGALAIEKCK
661 VMASKKKPLW LEFKCADPTA LSNETIGIIF KHGDDLQDM LILQILRIME SIWETESLDL
721 CLLPYGCIST GDKIGMIEIV KDATTIAKIQ QSTVGNTGAF KDEVLNHWLK EKSPTEEFQ
781 AAVERFVYSC AGYCVATFVL GIGDRHNDNI MITETGNLFH IDFGHILGNY KSFLGINKER
841 VPFVLTPDFL FVMGTSGKKT SPHFQKFQDI CVKAYLALRH HTNLLIILFS MMLMTGMPQL
901 TSKEDIEYIR DALTVGKNEE DAKKYFLDQI EVCARDKGTWV QFNWFLHLVL GIKQGEKHS
961 HHHHHH (SEQ ID NO: 13)

```

Proteína y constructo de PI3Kδ

PI3Kδ	BV1060	p85iSH2(461-568)-GGGGGG-p110δ(2-1044)-His
-------	--------	---

5 BV1060: Se generaron productos de PCR para el dominio entre SH2 (iSH2) de la subunidad p85 y para la subunidad p110δ de longitud completa y se fusionaron mediante PCR solapante. Se generó el producto de PCR de iSH2 usando como molde el ORF318 (véase anteriormente) y los cebadores gwG130-p03 (5'-GGGACAAG-TTTGTACAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGC-GAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 7) y gwG154-p04 (5'-TCCTCCTCCT-CCTCCTCCTGGTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC-3') (SEQ ID NO: 14). Se obtuvo el fragmento p110δ a partir de ADNc de primera hebra generado mediante RT-PCR a partir de ARN humano comercial de placenta, testículos y cerebro (Clontech), usando inicialmente los cebadores gwG154-p01 (5'-ATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCAT-3') (SEQ ID NO: 15) y gwG154-p02 (5'-CTACTGCCTGT-TGTCTTTGGACACGT-3') (SEQ ID NO: 16). En una reacción de PCR posterior se añadieron secuencias de ligador y una cola de histidina en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento p110δ respectivamente, usando los cebadores gw154-p03 (5'-ATTAACAGGAGGAGGAGGAGGAGGACCCCTGGGGTGGAC-TGCCCATGGA-3') (SEQ ID NO: 17) y gwG154-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGAT-GTGCT-CCCTGCCTGTTGTCTTTGGACACGTTGT-3') (SEQ ID NO: 18). Se ensambló la proteína de fusión p85-iSH2/p110δ en una tercera reacción de PCR mediante los ligadores solapantes en el extremo 3' del fragmento iSH2 y el extremo 5' del fragmento p110δ, usando el cebador gwG130-p03 anteriormente mencionado y un cebador que contenía una cola de histidina solapante y las secuencias de recombinación de AttB2 de Gateway (Invitrogen) (5'-GGG-ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAA-GCTCCGTGATGGTGATGGTGAGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 19). Se recombinó este producto final en una reacción de Gateway OR en el vector donador pDONR201 (Invitrogen) para generar el clon de entrada ORF319. Se verificó este clon mediante secuenciación y se usó en una reacción de Gateway LR (Invitrogen) para transferir el inserto al vector pBlueBac4.5 adaptado para Gateway (Invitrogen) para la generación del vector de expresión en baculovirus LR415.

Secuencia de proteína de BV1060:

```

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRRISEII DSRRRLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GGGGPPGVD
121 CPMEFWTKEE NQSVVVDVFL PTGVYLNFPV SRNANLSTIK QLLWHRAQYE PLFHMLSGPE
181 AYVFTCINQT AEQQELEDEQ RRLCDVQPFL PVLRLVAREG DRVKKLINSQ ISLLIGKGLH
241 EFDSLCDPEV NDFRAKMCQF CEEAAARRQQ LGWEAWLQYS FPLQLEPSAQ TWGPGLRLRP
301 NRALLVNVKF EGSEESFTFQ VSTKDVPLAL MACALRKKAT VFRQPLVEQP EDYTLQVNGR
25 361 HEYLYGSYPL CQFYICSL HSGLTPLHTM VHSSSILAMR DEQSNPAPQV QKPRAKPPPI

```

421 PAKKPSSVSL WSLEQPFRIE LIQGSKVNAD ERMKLVVQAG LFHGNEMLCK TVSSSEVSVC
 481 SEPVVKQRLE FDINICDLPR MARLCFALYA VIEKAKKARS TKKSKKADC PIAWANLMLF
 541 DYKDQLKTGE RCLYMWPSVP DEKGELLNPT GTVRSNPNTD SAAALLICLP EVAPHPVYYP
 601 ALEKILELGR HSECVHVTEE EQLQLREILE RRGSGELYEH EKDLVWKL RH EVQEHFPEAL
 661 ARLLLVTKWN KHEDVAQMLY LLCSWPELPV LSALELLDFS FPDCHVGSFA IKSLRKL TDD
 721 ELFQYLLQLV QVLKYESYLD CELTKFLDR ALANRKIGHF LFWHLRSEMH VPSVALRFG
 781 ILEAYCRGST HHMKVLMKQG EALS KLKALN DFKVLSQKT PKPQTKELMH LCMRQEAYLE
 841 ALSHLQSPLD PSTLLAEVCV EQCTFMDSKM KPLWIMYSNE EAGSGGSGVI IFKNGDDL RQ
 901 DMLTLQMIQL MDVLWKQEGL DLRMPY GCL PTGDRTGLIE VVLRSDTIAN IQLNKS NMAA
 961 TAAFNKDALL NWLKS KNPG EALDRAIEEFT LSCAGYCVAT YVLGIGDRHS DNIMIRESGQ
 1021 LFHIDFGHFL GNFKTKFGIN RERV PFILTY DFKVHVIQGGK TNNSEKFERF RGYCERAYTI
 1081 LRRHGLLFLH L FALMRAAGL PELSCSKDIQ YLKDSLALGK TEEEAL KHFR VKFNEALRES
 1141 WKTKVNWLAH NVSKDNRQEL GGAHHHHHH (SEQ ID NO: 20)

Purificación de constructos de PI3K α , PI3K β y PI3K γ

Se purificaron PI3K α , PI3K β y PI3K γ en dos etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) sobre una resina de Ni-Sepharose (GE Healthcare) y filtración en gel usando una columna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare). Se enfriaron todos los tampones hasta 4°C y se realizó la lisis enfrida con hielo. Se realizó el fraccionamiento de columna a temperatura ambiente. Todos los tampones usados para purificar PI3K β contenían Triton X100 al 0,05% además de lo descrito a continuación.

Se resuspendieron células congeladas convencionalmente de 10 l de cultivo celular Tn5 en “tampón de lisis” Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, imidazol 5 mM, NaF 1 mM, ácido okadaico (OAA) 0,1 μ g/ml, BME 5 mM, 1 x cóctel inhibidor de proteasa completo – libre de EDTA (20 comprimidos/1 l de tampón, Roche Applied Sciences), Benzozase (25 U/ml de tampón, EMD Biosciences) a una razón de 1:6 v/v de sedimento frente a tampón de lisis, y se sometieron a lisis mecánica mediante 20 carreras en homogeneizador de tipo Dounce usando una mano de almirez de ajuste apretado. Se centrifugó el lisado a 45.000 g durante 30 minutos, y se cargó el sobrenadante sobre una columna de IMAC previamente equilibrada (3 ml de resina/100 ml de lisado). Se lavó la columna con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido por un segundo lavado de 3-5 volúmenes de columna con Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, imidazol 45 mM, NaF 1 mM, OAA 0,1 μ g/ml, BME 5 mM, 1x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA. Se eluyó la proteína con Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, glicerol al 5%, imidazol 250 mM, NaF 1 mM, OAA 0,1 μ g/ml, BME 5 mM, 1x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA. Se analizaron las fracciones pertinentes mediante SDS-PAGE y se combinaron en consecuencia. Se purificó adicionalmente la proteína mediante filtración en gel sobre una columna Superdex 200 26/60 equilibrada en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, glicerol al 5%, NaF 1 mM, DTT 5 mM, 1x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA. Se analizaron las fracciones pertinentes mediante SDS-PAGE y se combinaron en consecuencia. Se añadió un volumen igual de tampón de diálisis (Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 50%, NaF 5 mM, DTT 5 mM) a la combinación y después se dializó frente a tampón de diálisis con dos cambios (un cambio durante la noche). Se almacenó la proteína a -20°C.

Purificación de PI3K δ

Se purificó PI3K δ en tres etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad con metal inmovilizado sobre una resina de Ni-Sepharose (GE Healthcare), filtración en gel usando una columna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare), y finalmente una etapa de intercambio iónico sobre una columna Q-HP (GE Healthcare). Se enfriaron todos los tampones hasta 4°C y se realizó la lisis enfrida con hielo. Se realizó el fraccionamiento de columna a temperatura ambiente.

Se resuspendieron células congeladas convencionalmente de 10 l de cultivo celular Tn5 en “tampón de lisis” Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, imidazol 5 mM, NaF 1 mM, ácido okadaico (OAA) 0,1 μ g/ml, BME 5 mM, 1 x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA (20 comprimidos/1 l de tampón, Roche Applied Sciences), Benzozase (25 U/ml de tampón de lisis, EMD Biosciences) a una razón de 1:10 v/v de sedimento con respecto a tampón de lisis, y se sometieron a lisis mecánica mediante 20 carreras en homogeneizador de tipo Dounce usando una mano de almirez de ajuste apretado. Se centrifugó el lisado a 45.000 g durante 30 minutos, y se cargó el sobrenadante sobre una columna de IMAC previamente equilibrada (5 ml de resina/100 ml de lisado). Se lavó la columna con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido por un segundo lavado de 3-5 volúmenes de columna con Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, imidazol 40 mM, NaF 1 mM, OAA

0,1 µg/ml, BME 5 mM, 1 x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA. Se eluyó la proteína con Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, imidazol 250 mM, NaF 1 mM, OAA 0,1 µg/ml, BME 5 mM, 1 x cóctel inhibidor de proteasa completo - libre de EDTA. Se analizaron las fracciones pertinentes mediante SDS-PAGE y se combinaron en consecuencia. Se purificó adicionalmente la proteína mediante filtración en gel sobre una columna Superdex 200 equilibrada en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, NaF 1 mM, OAA 0,1 µg/ml, DTT 5 mM, 1 x cóctel inhibidor de proteasa completo – libre de EDTA. Se analizaron las fracciones pertinentes mediante SDS-PAGE y se combinaron en consecuencia. Se diluyeron estas fracciones a una razón de 1:10 v/v de volumen de combinación con respecto a tampón con “tampón A” Tris-Cl 20 mM, pH 8,2, glicerol al 5%, NaF 1 mM, OAA 0,1 µg/ml, DTT 5 mM y se cargaron sobre una columna Q-HP preparada. Tras completarse la carga de la muestra, se lavó con tampón A y el 5% de “tampón B” Tris-Cl 20 mM, pH 8,2, NaCl 1 M, glicerol al 5%, NaF 1 mM, OAA 0,1 µg/ml, DTT 5 mM con 3-5 volúmenes de columna. Se eluyó la proteína usando un gradiente del 5%-30% de tampón B. Normalmente la proteína eluye a NaCl ~200 mM. Se analizaron las fracciones pertinentes mediante SDS-PAGE y se combinaron en consecuencia. Se añadió un volumen igual de tampón de diálisis (Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 50%, NaF 1 mM, OAA 0,1 µg/ml, DTT 5 mM) a la combinación y después se dializó frente a tampón de diálisis con dos cambios (un cambio durante la noche). Se almacenó la proteína a -20°C.

Se obtuvieron los siguientes resultados usando los ensayos descritos anteriormente.

ej.	PI3K α /CI50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	PI3K β /CI50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	PI3K δ /CI50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	PI3K γ /CI50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$]
15	0,008	1,212	0,077	1,097

El compuesto de la presente invención muestra selectividad por PI3K alfa con respecto a los subtipos beta y/o delta y/o gamma, por ejemplo tal como se mide en un ensayo bioquímico.

Ejemplo B: Determinación del aclaramiento metabólico *in vitro*

20 Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ALP	Posicionador automático de laboratorio
% de B	% de disolvente B de HPLC
BT	Biotransformación (o estabilidad metabólica o estabilidad microsomal)
[C] _{t=0}	Concentración <i>in vivo</i> de TA inicial (tiempo cero)
CL _h	Aclaramiento hepático (ml/min/kg)
CL _{int}	Velocidad de aclaramiento intrínseca (µl de volumen de reacción/min/mg de proteína microsomal)
CL _{int,s}	Velocidad de aclaramiento intrínseca ajustada a escala para la masa hepática (ml de volumen de reacción/min/g de hígado)
Cyno	Macaco
CYP	Citocromo P450
DiH ₂ O	Agua desionizada
ER _h	Razón de extracción hepática
ESI	Ionización por electropulverización
fub	Fracción libre de fármaco en sangre o plasma
fum	Fracción libre de fármaco en microsomas
IS	Patrón interno
k _{mic}	Velocidad de eliminación en microsomas
KPi	Tampón de fosfato de potasio 0,05 M, pH 7,4
CL-EM/EM	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
LOD	Límite de detección
M	Contenido de proteína microsomal en la incubación (mg/ml)
NADPH	β-Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, forma reducida
NCE	Nueva entidad química
NSB	Unión no específica
Q _h	Flujo de sangre portal (ml/min/kg)
RPM	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
S-D	Sprague-Dawley
SF1	Factor de ajuste a escala: mg de proteína microsomal por gramo de hígado
SF2	Factor de ajuste a escala: gramo de hígado por kg de peso corporal de animal
t _{1/2}	Semivida de aclaramiento <i>in vitro</i> (min)
TA	Artículo de prueba
UDPGA	Ácido uridin-5'-difosfoglucurónico
UGT	Uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferasas

V Volumen de incubación de reacción (µl)

A continuación (tabla 1) se muestran las concentraciones finales de artículo de prueba y de proteína, así como la duración de la incubación. Se seleccionaron concentraciones de artículo de prueba bajas para cumplir con la suposición de que las cinéticas de reacción se evalúan a una concentración inferior (o aproximadamente igual) a Km. Se sabe que DMSO tiene un efecto inhibitor sobre la actividad CYP. Por tanto, se limitó la concentración de DMSO en los medios de incubación al 0,01% (v/v) de modo que se minimiza la interferencia con el proceso metabólico.

Tabla 1 Componentes de reacción y concentraciones finales en incubaciones de aclaramiento metabólico

Componente de reacción	Concentración de reacción final
Tampón de fosfato de potasio (KPi), pH 7,4	50 mM
MgCl ₂	2,0 mM
NADPH	1,0 mM
UDPGA ^a	1,0 mM
Alametacina ^a	25 µg/mg de microsomas hepáticos
Microsomas hepáticos	0,5 mg/ml
Artículo de prueba	1,0 µM
CAN	0,06% (v/v)
DMSO (disolvente para artículo de prueba)	0,01% (v/v)

^a Componentes opcionales requeridos únicamente para reconstituir la actividad UGT (uridina 5'-difosfato glucuronosiltransferasas).

Se realiza un experimento típico en formato de 96 pocillos con incubación con agitación a 37°C. Se deriva la velocidad de aclaramiento metabólico *in vitro* a partir de datos recopilados en cuatro puntos de tiempo (por ejemplo, 0, 5, 15 y 30 minutos) en una reacción que incluye cofactor(es) (NADPH y/o UDPGA). También se realiza una incubación con control negativo de 30 minutos (sin cofactor) para evaluar cuestiones de estabilidad no relacionadas con CYP (por ejemplo, inestabilidad química, metabolismo independiente de CYP).

En general, se diluyen TA en DMSO 10 mM 1:1000 en ACN al 0,6% (v/v) en DiH₂O hasta 10 µM. Inmediatamente antes del comienzo del experimento, se suspenden 1,25 mg/ml de proteína microsomal en KPi 50 mM. Para la evaluación del metabolismo mediado por UGT, en primer lugar puede tratarse previamente la suspensión mediante incubación de 5 min sobre hielo con alametacina (25 µg/mg de proteína microsomal). Se añade TA (35 µl) a 140 µl de las suspensiones microsomales para obtener 175 µl de mezcla de enzima-sustrato. Se incuba previamente esta mezcla de enzima-sustrato durante 15 min a 37°C. Se procesa la incubación con control negativo de 30 min combinando 25 µl de mezcla de enzima-sustrato con un volumen igual de KPi 50 mM que contiene MgCl₂ 4 mM. Tras una incubación de 30 minutos a 37°C, se extingue la mezcla añadiendo 50 µl de ACN que contiene el patrón interno de EM (alprenolol 2 µM). Se procesa el punto de tiempo T=0 min combinando 25 µl de mezcla de enzima-sustrato directamente con 50 µl de ACN que contiene el patrón interno de EM (alprenolol 2 µM). Se añaden 25 µl de la disolución de cofactor (NADPH 2 mM en KPi 50 mM más MgCl₂ 4 mM; que incluye opcionalmente UDPGA 2 mM para ensayos con CYP+UGT) para estimular la extinción completa de la mezcla de reacción.

Se inician las reacciones en masa para los puntos de tiempo restantes mediante adición de 125 µl de disolución de cofactor (NADPH 2 mM en KPi 50 mM más MgCl₂ 4 mM) a los 125 µl restantes de mezcla de enzima-sustrato. Para determinar el metabolismo de UGT, también se incluye UDPGA 2 mM en la disolución de cofactor. En puntos de tiempo de reacción específicos (por ejemplo, 5, 15, 30 minutos), se retiran alícuotas de reacción (50 µl) y se terminan las reacciones mediante adición de acetonitrilo (50 µl que contiene patrón interno de espectrometría de masas (alprenolol 2 µM). Se centrifugan todas las muestras a ~3400xg a 4°C durante 10 min y se analizan los sobrenadantes mediante CL-EM/EM para la cuantificación del TA restante. Se usa el porcentaje de TA restante, con respecto a 0 minutos, para estimar la constante de velocidad de eliminación *in vitro* (k_{mic}) que puede usarse para calcular velocidades de aclaramiento metabólico *in vitro*.

Se realiza el análisis de muestras en un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas en tándem (CL/EM) que consiste en un espectrómetro de masas Waters Quattro Premiere, una fuente iónica de ESI, un inyector automático CTC-HTS Pal, y una bomba de CL Agilent. Se separan las muestras en una columna Atlantic C18, 2,1x30 mm, 3,5 micrómetros, usando el gradiente de fase móvil rápido expuesto en la tabla 2. La fase móvil A consiste en agua purificada que contiene formiato de amonio 10 mM. La fase móvil B consiste en acetonitrilo que contiene ácido fórmico al 0,01%. La velocidad de flujo es de 1 ml/min. El volumen de inyección es de 10 µl. Los primeros 30 segundos de elución se desvían al desecho para la limpieza de la muestra. Se detectan los compuestos usando el software MassLinx/QuanLinx que recopila datos de intensidad para todos los fragmentos relacionados con el peso molecular del compuesto de prueba. Tras recopilar los datos sin procesar, el software puede combinar los perfiles de hasta 3 fragmentos de calidad si es necesario. Generalmente, se integra el pico de fragmento de mayor intensidad.

Tabla 2 Gradiente de fase móvil para HPLC

Tiempo (min)	% de B
0,0	5
0,2	5
0,85	95
1,02	95
1,05	5

5 Cada velocidad de eliminación microsomal, k_{mic} , se basa en una curva de eliminación de 4 puntos sometida a prueba de manera individual. Los datos sin procesar de CL-EM/EM para una placa de reacción se devuelven como áreas de pico de analito integradas para TA e IS. Estos valores pueden convertirse en razones de área de pico de analito:IS para normalizar las comparaciones de datos.

10 El punto de tiempo de reacción (por ejemplo, 0, 5, 20 ó 30 min) se representa gráficamente frente al logaritmo natural del porcentaje de TA que queda con respecto a 0 minutos (basándose en la razón de áreas de pico relativas). Se usa la pendiente de esta representación gráfica del aclaramiento, k_{mic} , para calcular la semivida *in vitro*, $t_{1/2}$, tal como se muestra en la ec. (1). Con el fin de centrarse en la cinética de reacción lineal, siempre que sea posible, se excluyen generalmente puntos de datos que representan <10% de TA restante de la definición de la pendiente de representación gráfica de aclaramiento. La $t_{1/2}$ de reacción es el valor experimental central usado para calcular CLint (ec. 2)

Ec. (1): $t_{1/2} = 0,693/-k_{mic}$

Ec. (2): $CL_{int} = 0,693/-k_{mic} \cdot V/M$

15 Los siguientes resultados se obtuvieron usando el procedimiento descrito anteriormente:

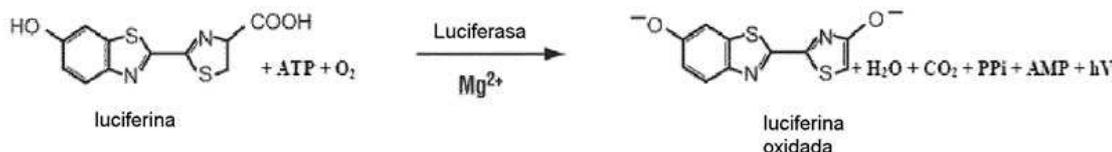
ejemplo	CYP MetCL-Ra / CL(int) [$\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	CYP MetCL-Hu / CL(int) [$\mu\text{l min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]
ejemplo comparativo,		
WO2004/096797, n.º 133	56	37
ejemplo según esta invención		
15	29	33

Ejemplo C: Inhibición de mutantes de PI3K alfa, E545K y H1047R, determinada en un ensayo de luminiscencia de luciferasa

20 La luminiscencia es una lectura bien establecida para determinar concentraciones de ATP y por tanto puede usarse para realizar un seguimiento de la actividad de muchas cinasas independientemente de su sustrato. El ensayo de cinasa luminiscente KinaseGlo (Promega, Madison/ WI, EE.UU.) es un método de HTS homogéneo de medición de la actividad cinasa mediante cuantificación de la cantidad de ATP que queda en disolución tras una reacción con cinasa.

25 Se incubó fosfoinosítido 3-cinasa a temperatura ambiente en 50 μl de medio que contenía ATP 1 μM , MgCl_2 5 mM, NaCl 50 mM, fosfatidilinositol de soja 5 $\mu\text{g/ml}$ (Avanti Polar lipids, n.º de cat. 840044C), octoglucósido al 0,015% (Sigma, n.º de cat. 09882), CHAPS al 0,01%, DTT 1 mM, DMSO al 2,5% y Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Se inició la reacción con cinasa mediante la adición de ATP (incubación previa de 15 min de enzima con inhibidor) y se detuvo tras 1 h con 50 μl KinaseGlo® (Promega, n.º de cat. V6714) y se midió la luminiscencia mediante un lector Victor II (integración de 0,1 s). Se ajustaron las curvas mediante regresión no lineal usando la ecuación logística (modelo 205 de XLfit®, ID Business Solutions, Guildford, R.U.).

30 Principio del ensayo de luminiscencia (KinaseGlo):



Usando el sistema de ensayo anterior y usando proteínas PI3K obtenidas a partir de constructos mostrados en la siguiente tabla

ES 2 560 673 T3

Tipo	Código	Construido
Tipo natural	BV1075	p85iSH2(461-568)-GGGGGGGGGGG-p110 α (21-1068)-His
E545K	BV1147	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGIMV-p110 α (21-E542K-1068)-His
H1047R	BV1097	p85iSH2(461-568)-GGISGGGGGIMV-p110 α (21-H1047R-1068)-His

Se evaluó la actividad inhibidora frente a PI3Kalfa de tipo natural y mutante. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Inhibición de PI3Kalfa de tipo natural y mutante:

Ejemplo	PI3Kalfa de tipo natural	PI3Kalfa E545K	PI3Kalfa H1047R
		CI ₅₀ en nM	
15	4,6	4,0	4,8

- 5 BV1147: Se introdujo la mutación de activación E545K, que se encuentra en muchos cánceres, en ORF318 mediante mutagénesis dirigida al sitio con el kit de mutagénesis QuickChange XL (Stratagene). Usando el método recomendado por el fabricante y los cebadores mutagénicos gwG152-p15 (5'-CTCTCTGAAATCACTAAGCAGGAGAAAGATTTT-3') (SEQ ID NO: 21) y gwG152-p16 (5'-AAAATCTTTCT-CCTGCTTAGTGATTTTCAGAGAG-3') (SEQ ID NO: 22) se generó ORF544. Se verificó este clon mediante secuenciación y se usó en una reacción de Gateway LR (Invitrogen) para transferir el inserto al vector pBlueBac4.5 adaptado para Gateway (Invitrogen) para la generación del vector de expresión en baculovirus LR561.

Dominio de cinasa.

Secuencia de proteína de BV 1147:

```

1  MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61  EIQRIMHNYD KLKSRRIEII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFFDETRRL CDLRLFQPFV KVIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCFED MVKDPEVQDF
241 RRNINLVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESPELPK HIYNKLDKGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMN
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLRA ARLCLSICSV KGRKGAKEEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPNKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITKQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNRSDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL

721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNEI
901 IFKNGDDLRLQ DMLTLQIIRI MENIWQNGQL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFSMMLGSG MPQLQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALYF
1141 MKQMNDAAHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAAHHHHH (SEQ ID NO: 23).

```

- 15 BV1097: Se introdujo la mutación de activación H1047R, que se encuentra en muchos cánceres, en ORF318 mediante mutagénesis dirigida al sitio con el kit de mutagénesis QuickChange XL (Stratagene).

Usando el método recomendado por el fabricante y los cebadores mutagénicos gwG152-p07 (5'-CAAATGAATGATGCACGTCATGGTGGCTGGACA-3') (SEQ ID NO: 24) y gwG152-p11 (5'-TGTCAGCCA-

ES 2 560 673 T3

CCATGACGTGCATCATTTCATTTG-3') (SEQ ID NO: 25) se generó ORF396. Se verificó este clon mediante secuenciación y se usó en una reacción de Gateway LR (Invitrogen) para transferir el inserto al vector pBlueBac4.5 adaptado para Gateway (Invitrogen) para la generación del vector de expresión en baculovirus LR480.

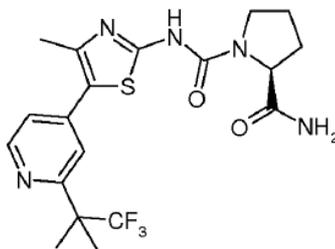
Dominio de cinasa.

5 Secuencia de proteína de BV 1097:

1 MREYDRLYEE YTRTSQEIQM KRTAIEAFNE TIKIFEEQCQ TQERYSKEYI EKFKREGNEK
61 EIQRIMHNYD KLKSRISII DSRRLLEEDL KKQAAEYREI DKRMNSIKPG GISGGGGGIM
121 VLVECLLPNG MIVTLECLRE ATLITIKHEL FKEARKYPLH QLLQDESSYI FVSVTQEAER
181 EEFFDETRRL CDLRLFQPFL KVIEPVGNRE EKILNREIGF AIGMPVCEFD MVKDPEVQDF
241 RRNINLVCKE AVDLRDLNSP HSRAMYVYPP NVESPELKP HIYNKLDKGGQ IIVVIWVIVS
301 PNNDKQKYTL KINHDCVPEQ VIAEAIKKT RSMLLSSEQL KLCVLEYQGGK YILKVCGCDE
361 YFLEKYPLSQ YKYIRSCIML GRMPNLMLMA KESLYSQLPM DCFTMPSYSR RISTATPYMM
421 GETSTKSLWV INSALRIKIL CATYVNVNIR DIDKIYVRTG IYHGGEPLCD NVNTQRVPCS
481 NPRWNEWLNY DIYIPDLRA ARLCLSICSV KGRKGAKKEEH CPLAWGNINL FDYTDTLVSG
541 KMALNLWPVP HGLEDLLNPI GVTGSNPNKE TPCLELEFDW FSSVVKFPDM SVIEEHANWS
601 VSREAGFSYS HAGLSNRLAR DNELRENDKE QLKAISTRDP LSEITEQEKD FLWSHRHYCV
661 TIPEILPKLL LSVKWNSRDE VAQMYCLVKD WPPIKPEQAM ELLDCNYPDP MVRGFAVRCL
721 EKYLTDKLS QYLIQLVQVL KYEQYLDNLL VRFLKALT NQRIGHFFFW HLKSEMHNKT
781 VSQRFGLLE SYCRACGMYL KHLNRQVEAM EKLINLTDIL KQEKKDETQK VQMKFLVEQM
841 RRPDFMDALQ GFLSPLNPAH QLGNLRLLEC RIMSSAKRPL WLNWENPDIM SELLFQNEI
901 IFKNGDDLQ DMLTLQIIRI MENIWQNGQL DLRMLPYGCL SIGDCVGLIE VVRNSHTIMQ
961 IQCKGGLKGA LQFNSHTLHQ WLKDKNKGEI YDAAIDLFTR SCAGYCVATF ILGIGDRHNS
1021 NIMVKDDGQL FHIDFGHFLD HKKKKFGYKR ERVPFVLTQD FLIVISGAQ ECTKTREFER
1081 FQEMCYKAYL AIRQHANLFI NLFMMLGSG MPELQSFDDI AYIRKTLALD KTEQEALYF
1141 MKQMNDARHG GWTTKMDWIF HTIKQHALNE LGGAHHHHHH (SEQ ID NO: 26).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto 2-amida y 1-({4-metil-5-[2-(2,2,2-trifluoro-1,1-dimetiletil)-piridin-4-il]-tiazol-2-il}-amida) del ácido (S)-pirrolidin-1,2-dicarboxílico, de estructura:



- 5 en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para su uso como producto farmacéutico.
3. Uso del compuesto según la reivindicación 1, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- 10 4. Uso según la reivindicación 3, en el que el cáncer se selecciona de sarcoma; de pulmón; bronquio; próstata; mama; páncreas; cáncer gastrointestinal; de colon; recto; carcinoma de colon; adenoma colorrectal; de tiroides; hígado; vías biliares intrahepáticas; hepatocelular; de glándula suprarrenal; estómago; gástrico; glioma; glioblastoma; endometrial; melanoma; de riñón; pelvis renal; vejiga urinaria; cuerpo uterino; cuello uterino; vagina; ovario; mieloma múltiple; de esófago; una leucemia; leucemia mielógena aguda; leucemia mielógena crónica;
- 15 leucemia linfocítica; leucemia mieloide; cerebral; un carcinoma del cerebro; cavidad oral y faringe; laringe; intestino delgado; linfoma no Hodgkin; melanoma; adenoma vellosa de colon; una neoplasia; una neoplasia de carácter epitelial; linfomas; un carcinoma de mama; carcinoma de células basales; carcinoma de células escamosas; queratosis actínica; enfermedades tumorales, incluyendo tumores sólidos; un tumor de cabeza o cuello; policitemia vera; trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide; y enfermedad de Walden-Stroem.
- 20 5. Composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto según la reivindicación 1, en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 25 6. Composición farmacéutica combinada, adaptada para la administración simultánea o secuencial, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto según la reivindicación 1 en forma libre o en forma de sal farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más parejas de combinación; y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 5 o composición farmacéutica combinada según la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 30 8. Compuesto según la reivindicación 1 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 35 9. Compuesto según la reivindicación 8 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un cáncer seleccionado de sarcoma; de pulmón; bronquio; próstata; mama; páncreas; cáncer gastrointestinal; de colon; recto; carcinoma de colon; adenoma colorrectal; de tiroides; hígado; vías biliares intrahepáticas; hepatocelular; de glándula suprarrenal; estómago; gástrico; glioma; glioblastoma; endometrial; melanoma; de riñón; pelvis renal; vejiga urinaria; cuerpo uterino; cuello uterino; vagina; ovario; mieloma múltiple; de esófago; una leucemia; leucemia mielógena aguda; leucemia mielógena crónica; leucemia linfocítica; leucemia mieloide; cerebral; un carcinoma del cerebro; cavidad oral y faringe; laringe; intestino delgado; linfoma no Hodgkin; melanoma; adenoma vellosa de colon; una neoplasia; una neoplasia de carácter epitelial; linfomas; un carcinoma de mama; carcinoma de células basales; carcinoma de células escamosas; queratosis actínica; enfermedades tumorales,
- 40 incluyendo tumores sólidos; un tumor de cabeza o cuello; policitemia vera; trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide; y enfermedad de Walden-Stroem.