

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 982**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/519** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764605 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2694075**

54 Título: **Inhibidor de fosfoinosítido 3-quinasa con un resto de unión a cinc**

30 Prioridad:

**01.04.2011 US 201161470849 P**

**14.11.2011 US 201161559489 P**

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

**19.07.2016**

73 Titular/es:

**CURIS, INC. (100.0%)**  
**4 Maguire Road**  
**Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**CAI, XIONG;**  
**ZHAI, HAIXIAO;**  
**LAI, CHENGJUNG;**  
**QIAN, CHANGGENG y**  
**BAO, RUDI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 577 982 T3**

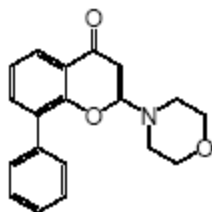
Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar 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

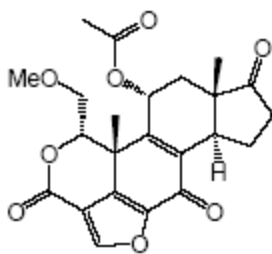
Inhibidor de fosfoinosítido 3-quinasa con un resto de unión a cinc

## Antecedentes de la invención

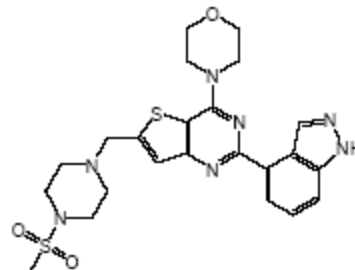
- 5 Los fosfoinosítidos (PI), que son derivados fosforilados de fosfatidilinositol, son esenciales en las células eucarióticas, regulando procesos nucleares, dinámicas de citoesqueleto, señalización y tráfico de membrana. Entre las enzimas involucradas en el metabolismo de PI, las PI3-quinasas (PI3K) han atraído una atención especial debido a sus propiedades oncogénicas y potencial como dianas de fármacos. Las PI3-quinasas fosforilan fosfatidilinosítoles o PIs en la posición 3 del anillo inositol. (Lindmo et al. *Journal of Cell Science* **119**, 605-614, 2006). Los fosfolípidos fosforilados en 3 generados por la actividad de PI3K se unen al dominio de homología pleckstrina (PH) de la proteína quinasa B (PKB), provocando translocación de PKB a la membrana celular y la fosforilación posterior de PKB. La PKB fosforilada inhibe proteínas que inducen apoptosis tales como FKHR, Bad, y caspasas, y se considera que juega un papel importante en la progresión del cáncer. Las PI3K se dividen en las clases I-III, y la clase I además es subclasificada en las clases Ia y Ib. Entre estas isoformas, las enzimas de clase Ia se considera que juegan el papel más importante en la proliferación celular, en respuesta a la activación de la ruta tirosina quinasa-factor de crecimiento (Hayakawa et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14** 6847-6858, 2006). Tres mutaciones frecuentes en el cáncer activan constitutivamente PI3K $\alpha$ , y cuando se expresan en células, dirigen la transformación oncogénica y activación crónica de señalización corriente abajo por moléculas tales como PKB, S6K y 4E bp1 que se ve comúnmente en células de cáncer. (Stephens et al., *Current Opinion in Pharmacology*, **5(4)** 357-365, 2005). Como tales, las PI3-quinasas son dianas atractivas para el tratamiento de enfermedades proliferativas.
- 20 Hay varios inhibidores de PI3-quinasa conocidos incluyendo Wortmannina y LY294002. Aunque wortmannina es un inhibidor de PI3K potente con bajo valor  $CI_{50}$  nanomolar, tiene baja actividad anti-tumoral *in vivo*. (Hayakawa et al, *Bioorg Med Chem* **14(20)**, 6847-6858 (2006)). Recientemente, un grupo de compuestos de quinazolina sustituida con morfolina, piridopirimidina y tienopirimidina, se ha reportado que es efectivo para inhibir PI3 quinasa p110 $\alpha$ . (Hayakawa, 6847-6858). La dosificación oral de un compuesto de tienopirimidina sustituido con morfolina (GDC-0941) ha mostrado supresión de xenoinjertos de tumor de glioblastoma *in vivo*. (Folkes et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, **51**, 5522-5532, 2008). Las siguientes publicaciones describen una serie de inhibidores de PI3 quinasa basados en tienopirimidina, piridopirimidina y quinazolina: WO 2008/073785; WO 2008/070740; WO 2007/127183; Publicación de Patente U.S. No. 20080242665; Publicación de Solicitud de Patente U.S. No. US20100222343;



LY294002



Wortmannina



GDC-0941

- 30 La acetilación de histona es una modificación reversible, estando catalizada la desacetilación por una familia de enzimas denominada histona desacetilasas (HDAC). Las HDAC se representan por 18 genes en los seres humanos y se dividen en cuatro clases distintas (*J Mol Biol*, **2004**, 338:1, 17-31). En mamíferos, la clase I de HDAC (HDAC1-3, y HDAC8) están relacionadas con RPD3 HDAC de levadura, clase 2 (HDAC4-7, HDAC9 y HDAC10) relacionadas con HDA1 de levadura, clase 4 (HDAC11), y clase 3 (una clase distinta que abarca las sirtuinas, que están relacionadas con Sir2) de levadura.

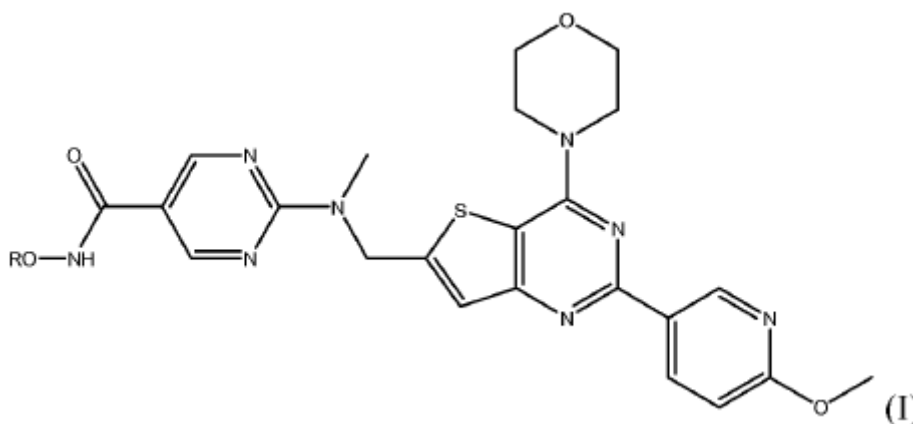
- 35 Csordas, *Biochem. J.*, **1990**, 286: 23-38 ilustra que las histonas están sometidas a acetilación post-traducción de los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos lisina N-terminales, una reacción catalizada por histona acetil transferasa (HAT1). La acetilación neutraliza la carga positiva de la cadena lateral de lisina, y se considera que impacta en la estructura de la cromatina. De hecho, el acceso de factores de transcripción a moldes de cromatina se aumenta por hiperacetilación de histona, y enriquecimiento en histona subacetilada H4 se ha encontrado en sitios silenciosos de transcripción del genoma (Taunton et al., *Science*, **1996**, 272:408-411). En el caso de genes supresores de tumores, el silenciado de transcripción debido a modificación de histona puede dar lugar a transformación oncogénica y cáncer.

- 45 Actualmente, varios investigadores clínicos están evaluando varias clases de inhibidores HDAC. Los ejemplos incluyen derivados de ácido hidroxámico, ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), PXD101 y LAQ824, actualmente están en desarrollo clínico. En la clase benzamida de inhibidores HDAC, MS-275, MGCD0103 y CI-994 han alcanzado pruebas clínicas. Mourné et al. (Abstract #4725, AACR 2005), demuestran que la modificación tiofenilo de benzamidas aumenta significativamente la actividad inhibitora de HDAC contra HDAC1.

Ciertos cánceres se han tratado efectivamente con este enfoque combinatorio; sin embargo, los regímenes de tratamiento utilizando una mezcla de fármacos citotóxicos, a menudo están limitados por toxicidades limitantes de dosis e interacciones de fármaco-fármaco. Los avances más recientes con fármacos dirigidos molecularmente, han proporcionado nuevos enfoques a tratamiento de combinación para cáncer, permitiendo que múltiples agentes dirigidos sean utilizados de forma simultánea, o combinando estas nuevas terapias con quimioterapéuticos estándar o radiación para mejorar el resultado sin alcanzar toxicidades limitantes de dosis. Sin embargo, la capacidad para utilizar estas combinaciones actualmente está limitada a fármacos que muestran propiedades farmacológicas y farmacodinámicas compatibles. Además, los requerimientos reguladores para demostrar seguridad y eficacia de terapias de combinación pueden ser más costosos y prolongados que las correspondientes pruebas de un solo agente. Una vez aprobadas, las estrategias de combinación también pueden asociarse con costes incrementados para los pacientes, así como disminuido cumplimiento del paciente debido a los paradigmas de dosificación más intrincados requeridos.

### Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un compuesto representado de Fórmula I:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde R es hidrógeno o un grupo acilo. El grupo acilo es preferiblemente  $R_1C(O)-$ , donde  $R_1$  es alquilo- $C_1-C_{24}$  sustituido o no sustituido, preferiblemente alquilo- $C_1-C_{10}$ , y más preferiblemente alquilo- $C_1-C_6$ ; alqueno- $C_2-C_{24}$  sustituido o no sustituido, preferiblemente alqueno- $C_2-C_{10}$ , y más preferiblemente alqueno- $C_2-C_6$ ; alquino- $C_2-C_{24}$  sustituido o no sustituido, preferiblemente alquino- $C_2-C_{10}$ , y más preferiblemente alquino- $C_2-C_6$ ; arilo sustituido o no sustituido, preferiblemente fenilo sustituido o no sustituido; o heteroarilo sustituido o no sustituido.

La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de Fórmula I y, en particular, el Compuesto I, tienen propiedades ventajosas para uso como agentes terapéuticos, tal como para el tratamiento de cánceres y otras enfermedades y trastornos asociados con la actividad de PI3 quinasa y/o actividad de HDAC. El Compuesto I, por ejemplo, tiene actividad inhibitoria potente frente a las dianas moleculares PI3K y HDAC y actividad antiproliferativa potente frente a una variedad de líneas de células de cáncer *in vitro*. El Compuesto I tiene una biodisponibilidad oral significativa como se observa en modelos animales. Después de la dosificación bien oral o intravenosa en ratones que portan xenoinjertos de tumor, el compuesto muestra una captación significativa por el tejido tumoral y actividad farmacodinámica en tejido tumoral. El Compuesto I también muestra actividad antitumoral sustancial en modelos de xenoinjertos de tumor en ratón después bien de administración oral o intravenosa. El compuesto también tiene un perfil de seguridad favorable, como se muestra, por ejemplo, por ensayo de genotoxicidad usando el ensayo de Ames.

La invención se refiere además a compuestos de la invención para uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con PI3K tales como cáncer. Estos compuestos actúan además como un inhibidor de HDAC gracias a su capacidad de unir iones cinc. Los compuestos son activos en múltiples dianas terapéuticas y son efectivos para tratar una variedad de enfermedades. Además, en algunos casos se ha encontrado que estos compuestos tienen actividad aumentada cuando se comparan con las actividades de combinaciones de moléculas separadas que individualmente tienen actividad inhibitoria de PI3 quinasa y actividad inhibitoria de HDAC. En otras palabras, la combinación de actividad inhibitoria de PI3 quinasa y HDAC en una única molécula puede proporcionar un efecto sinérgico comparado con inhibidores de PI3 quinasa y HDAC separadamente.

Además, la eficacia de agentes únicos inhibidores de la ruta PI3 quinasa está limitada por la presencia de alteraciones genéticas primarias/adquiridas y la activación de múltiples rutas pro-supervivencia y de crecimiento

(Engelman (2009) *Nature Reviews Cancer*, 9: 550-562). La inhibición de PI3K por agentes únicos inhibidores de la ruta PI3K puede de hecho regular al alza la señalización de la ruta RAF-MEK-ERK por la liberación de bucles de retroalimentación negativa. Los compuestos de la invención, gracias a sus actividades inhibitoras integradas de PI3K/HDAC, proporcionan el potencial de superar las limitaciones en el tratamiento de cánceres con inhibidores que tienen como única diana PI3K. Los compuestos de la invención interrumpen las rutas del cáncer en experimentos *in vivo* e *in vitro*, que resultan de la inhibición duradera de la ruta PI3K-AKT-mTOR, la inhibición de la ruta RAF-MEK-ERK, y la regulación a la baja de los niveles de proteína tirosina quinasa del receptor (RTK). Además, los compuestos de la invención inducen la parada del ciclo celular y apoptosis que resulta de la regulación al alza de los supresores tumorales p53 y p21 en líneas de células de tumor *in vitro*. De acuerdo con esto, los compuestos de la invención tienen el potencial de superar la resistencia a fármacos primaria y adquirida y pueden ser más eficaces que el mono-tratamiento con agentes únicos inhibidores de la ruta PI3K en aplicaciones clínicas.

Otro aspecto de la invención proporciona compuestos para uso en métodos para inhibir la actividad PI3 quinasa, poniendo en contacto una PI3 quinasa con una cantidad inhibitora efectiva de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

### 15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico de concentración del Compuesto 1 frente al tiempo en plasma y tejido tumoral después de la administración oral a ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor H2122.

La Figura 2A es un gráfico de la concentración en plasma del Compuesto 1 frente al tiempo en ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi después de dosificación oral a 25, 50 y 100 mg/kg.

20 La Figura 2B es un gráfico de la concentración de tumor del Compuesto 1 frente al tiempo en ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi después de dosificación oral a 25, 50 y 100 mg/kg.

La Figura 2C es un gráfico de concentración del Compuesto 1 frente al tiempo en plasma y tejido tumoral en ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi después de dosificación oral a 100 mg/kg.

25 La Figura 3 presenta transferencias Western de extractos de tejido tumoral de ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi control y tratados con el Compuesto 1 (25, 50 y 100 mg/kg).

La Figura 4 es un gráfico de concentración en plasma del Compuesto 1 frente al tiempo en perros beagle después de dosificación oral o intravenosa.

La Figura 5A es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor H2122 tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

30 La Figura 5B es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor Daudi tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

La Figura 5C es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor OPM2 tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

35 La Figura 6 es un gráfico que muestra los niveles en sangre circulante de linfocitos T y B después de tratamiento con el Compuesto 1 o vehículo.

Las Figuras 7A a 7G presentan transferencias Western de extractos de células H460 (Kras, PI3K) control y tratadas con el Compuesto 1. GDC es GDC-0941; LBH es LBH-589.

Las Figuras 8A a 8C presentan transferencias Western de extractos de células H1975 (EGFR, PI3K), BT474 (HER2, PI3K), H1975 (EGFR, PI3K), A375 (B-Raf) y RPMI-822 (p53) control y tratadas con el Compuesto 1.

40 La Figura 9 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi tratados oralmente con el Compuesto 1 o vehículo.

La Figura 10 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones Scid que portan xenoinjertos de tumor Daudi tratados con vehículo, Compuesto 1, SAH, GDC-0941 o una combinación de SAHA y GDC-0941.

45 La Figura 11 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor SU-DHL4 tratados oralmente con el Compuesto 1 o vehículo.

La Figura 12 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor OPM2 tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

La Figura 13 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones SCID que portan xenoinjertos de tumor MM1S tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

50 La Figura 14 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones SCID que portan xenoinjertos de tumor

MM1R tratados con el Compuesto 1 o vehículo.

La Figura 15 presenta transferencias Western de extractos tumorales de ratones SCID tratados con el Compuesto 1 que portan xenoinjertos de tumor Daudi, SuDHL-4, HS-Sultan, DOHH-2, OPM-2, MM1R o MM1S.

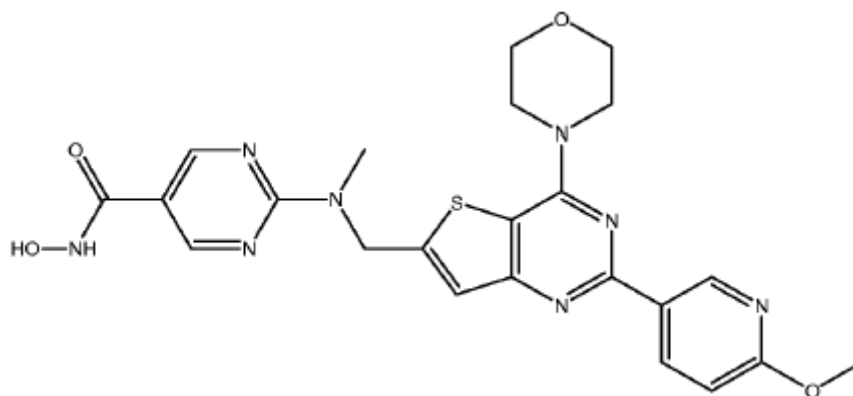
5 La Figura 16 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones SCID que portan tumor Daudi tratados con el Compuesto 1, CAL-101 o vehículo.

La Figura 17 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones SCID que portan tumor Daudi tratados con el Compuesto 1, ciclofosfamida, combinación de Compuesto 1 y ciclofosfamida o vehículo.

La Figura 18 es un gráfico de crecimiento tumoral frente al tiempo en ratones SCID que portan tumor MM1S tratados con el Compuesto 1, lenalidomida, combinación de Compuesto 1 y lenalidomida o vehículo.

## 10 Descripción detallada de la invención

En una realización preferida, el compuesto de Fórmula I se muestra a continuación:



15 (de aquí en adelante "Compuesto 1", también referido como N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención además proporciona compuestos para uso en métodos para la prevención o tratamiento de enfermedades o afecciones que involucran proliferación aberrante, diferenciación o supervivencia de células. En una realización, la invención además proporciona el uso de uno o más compuestos de la invención en la fabricación de un medicamento para detener o disminuir enfermedades que involucran proliferación aberrante, diferenciación, o supervivencia de las células. En realizaciones preferidas, la enfermedad es cáncer. En una realización, la invención se refiere a un compuesto para uso en un método para tratar cáncer en un sujeto que requiere tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención.

El término "cáncer" se refiere a cualquier cáncer provocado por la proliferación de células neoplásicas malignas, tales como tumores, neoplasmas, carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas y semejantes. Por ejemplo, los cánceres, incluyen, pero no están limitados a, mesotelioma, leucemias y linfomas tales como linfomas de células T cutáneas (CTCL), linfomas de células T periféricas no cutáneas, linfomas asociados con virus linfotrófico de células T humanas (HTLV) tales como leucemia/linfoma de células T de adulto (ATLL), linfoma de célula B, leucemias no linfocíticas agudas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, linfomas, y mieloma múltiple, linfoma no-Hodgkin, leucemia linfática aguda (ALL), leucemia linfática crónica (CLL), linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma-leucemia de células T adultas, leucemia mielóide aguda (AML), leucemia mielóide crónica (CML), o carcinoma hepatocelular. Los ejemplos adicionales incluyen síndrome mielodisplásico, tumores sólidos infantiles tales como tumores de cerebro, neuroblastoma, retinoblastoma, tumor de Wilms, tumores de huesos y sarcomas de tejido blando, tumores sólidos comunes de adultos tales como cánceres de cabeza y cuello (por ejemplo, oral, laríngeo, nasofaríngeo y esofágico), cánceres genitourinarios (por ejemplo, de próstata, vejiga, renal, uterino, ovarios, testicular), cáncer pulmonar (por ejemplo, de células pequeñas y de células no pequeñas), cáncer de mama, cáncer pancreático, melanoma y otros cánceres de piel, cáncer de estómago, tumores del cerebro, tumores relacionados con el síndrome de Gorlin (por ejemplo, meduloblastoma, meningioma, etc.), y cáncer de hígado. Las formas ejemplares adicionales de cáncer que pueden ser tratadas por los compuestos presentes incluyen, pero no están limitadas a, cáncer de músculo esquelético o liso, cáncer de estómago, cáncer de intestino delgado, carcinoma de recto, cáncer de glándulas salivares, cáncer endometrial, cáncer adrenal, cáncer anal, cáncer rectal, cáncer paratiroideo, y cáncer de pituitaria.

Los cánceres adicionales en los que los compuestos aquí descritos pueden ser útiles para prevenir, tratar y estudiar son, por ejemplo, carcinoma de colon, carcinoma de poliposis adenomatosa familiar y cáncer colorrectal sin poliposis hereditaria, o melanoma. Los, cánceres adicionales incluyen, pero no están limitados a, carcinoma labial, carcinoma

de laringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de lengua, carcinoma de glándula salivar, carcinoma gástrico, adenocarcinoma, cáncer de tiroides (carcinoma tiroideo medular y papilar), carcinoma renal, carcinoma de parénquima de riñón, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de cuerpo uterino, carcinoma de endometrio, carcinoma de corion, carcinoma de testículos, carcinoma urinario, melanoma, tumores del cerebro tales como glioblastoma, astrocitoma, meningioma, meduloblastoma y tumores neuroectodérmicos periféricos, carcinoma de vesícula biliar, carcinoma bronquial, mieloma múltiple, basalioma, teratoma, retinoblastoma, melanoma coroideo, seminoma, rabdomiosarcoma, craneofaringeoma, osteosarcoma, condrosarcoma, miosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Ewing y plasmocitoma. En un aspecto de la invención, la presente invención proporciona el uso de uno o más compuestos de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del

En una realización, los compuestos de la invención se usan para tratar un cáncer hematológico o afección precancerosa hematológica. Los cánceres hematológicos incluyen leucemias, linfomas y mieloma múltiple. Los ejemplos incluyen leucemias linfocíticas, tales como leucemia linfocítica aguda, incluyendo leucemia linfoblástica aguda de precursor de B, leucemia linfoblástica aguda de precursor de T, leucemia de Burkitt, y leucemia bifenotípica aguda; y leucemia linfocítica crónica, incluyendo leucemia prolinfocítica de células B; y leucemias mielógenas, tales como leucemia mielógena aguda, incluyendo leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, y leucemia megacarioblástica aguda; y leucemia mielógena crónica, incluyendo leucemia monocítica crónica; leucemia monocítica aguda. Otras leucemias incluyen leucemia de células pilosas; leucemia prolinfocítica de células T; leucemia linfocítica granular grande; y leucemia de células T del adulto. Los linfomas incluyen linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin, incluyendo linfomas de células B, linfomas de células T, tales como linfoma de células T cutáneas, y linfomas de células NK. Las afecciones precancerosas hematológicas incluyen síndrome mielodisplásico y trastornos mieloproliferativos, tales como mielofibrosis primaria, policitemia vera, y trombocitopenia esencial.

Se ha mostrado que los compuestos de la invención inducen linfopenia reversible y por lo tanto son útiles para eliminar o disminuir los niveles circulantes de células cancerosas del linaje linfocítico. Dichos compuestos también son útiles para tratar trastornos autoinmunes o para modular una respuesta inmune.

En una realización, la invención proporciona compuestos para uso en un método para reducir el recuento de linfocitos circulantes en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la invención. En una realización preferida, el recuento de linfocitos circulantes reducido es reversible, esto es, el recuento de linfocitos circulantes vuelve al intervalo normal después de detener la dosificación con el compuesto de la invención. En una realización, el recuento de linfocitos circulantes reducido está por debajo del intervalo normal y el sujeto es linfopénico. Preferiblemente, el sujeto obtiene un beneficio terapéutico o profiláctico del recuento de linfocitos circulantes reducido. Dichos sujetos incluyen aquellos que padecen una enfermedad hematológica, tal como un cáncer hematológico, aquellos que padecen un trastorno autoinmune, y aquellos que requieren la modulación de una respuesta inmune tales como los pacientes que padecen diabetes o receptores de trasplante de órganos. En un sujeto humano, el recuento de linfocitos circulantes, por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T o ambos, puede caer desde el intervalo normal hasta un intervalo linfopénico. En determinadas enfermedades, el recuento de linfocitos circulantes es anormalmente alto. En dichas enfermedades, el recuento de linfocitos circulantes puede reducirse hasta el intervalo normal o hasta un estado linfopénico.

En una realización, la presente invención incluye el uso de uno o más compuestos de la invención en la fabricación de un medicamento que previene la proliferación aberrante adicional, diferenciación o supervivencia de células. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden ser útiles para prevenir que los tumores incrementen en tamaño o lleguen a un estado metastásico. Los presentes compuestos pueden ser administrados para detener la progresión o avance del cáncer o para inducir apoptosis de tumor o para inhibir angiogénesis de tumor. Además, la presente invención incluye el uso de los presentes compuestos para prevenir la recurrencia del cáncer.

Esta invención además abarca compuestos para uso en el tratamiento o prevención de trastornos proliferativos celulares tales como hiperplasias, displasias y lesiones pre-cancerosas. La displasia es la forma más temprana de la lesión pre-cancerosa que se reconoce en una biopsia por un patólogo. Los presentes compuestos pueden ser administrados para el propósito de prevenir que dichas hiperplasias, displasias o lesiones pre-cancerosas continúen su expansión o que se vuelvan cancerosas. Los ejemplos de lesiones pre-cancerosas pueden ocurrir en la piel, tejido esofágico, tejido de mama y cervical intra-epitelial.

"Terapia de combinación" incluye la administración de los presentes compuestos en combinación adicional con otros ingredientes biológicamente activos (tales como, pero no limitados a, un segundo y diferente agente antineoplásico) y terapias sin fármaco (tales como, pero no limitadas a, cirugía o tratamiento de radiación). Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden emplearse en combinación con otros compuestos farmacéuticamente activos, de preferencia compuestos que son capaces de aumentar el efecto de los compuestos de la invención. Los compuestos de la invención pueden ser administrados en forma simultánea (como una sola preparación o preparación separada) o secuencialmente a la otra terapia de fármaco. En general, una terapia de combinación prevé la administración de dos o más fármacos durante un único ciclo o curso de terapia.

En un aspecto de la invención, los presentes compuestos pueden ser administrados en combinación con uno o más

agentes separados que modulan proteínas quinasas involucradas en diversos estados de enfermedad. Los ejemplos de estas quinasas pueden incluir, pero no están limitados a: quinasas específicas de serina/treonina, quinasas específicas de tirosina de receptor y quinasas específicas de tirosina no de receptor. Las quinasas de serina/treonina incluyen proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), quinasa específica de meiosis (MEK), RAF y aurora quinasa. Los ejemplos de familias de receptor quinasa incluyen el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (por ejemplo, HER2/neu, HER3, HER4, ErbB, ErbB2, ErbB3, ErbB4, Xmrk, DER, Let23); receptor de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (por ejemplo, FGF-R1, GFF-R2/BEK/CEK3, FGF-R3/CEK2, FGF-R4/TKF, KGF-R); receptor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGFR) (por ejemplo, MET, RON, SEA, SEX); receptor de insulina (por ejemplo, IGFI-R); Eph (por ejemplo, CEK5, CEK8, EBK, ECK, EEK, EHK-1, EHK-2, ELK, EPH, ERK, HEK, MDK2, MDK5, SEK); Axl (por ejemplo, Mer/Nyk, Rse); RET; y receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) (por ejemplo, PDGF $\alpha$ -R, PDGF $\beta$ -R, CSF1-R/FMS, SCF-R/C-KIT, VEGF-R/FLT, NEK/FLK1, FLT3/FLK2/STK-1). Las familias de tirosina quinasa no de receptor incluyen, pero no están limitadas a, BCR-ABL (por ejemplo, p43<sup>abl</sup>, ARG); BTK (por ejemplo, ITK/EMT, TEC); CSK, FAK, FPS, JAK, SRC, BMX, FER, CDK y SYK.

En otro aspecto de la invención, los presentes compuestos pueden ser administrados en combinación con uno o más agentes separados que modulan dianas o procesos biológicos sin quinasa. Estas dianas incluyen histona desacetilasas (HDAC), ADN metiltransferasa (DNMT), proteínas de choque térmico (por ejemplo, HSP90), proteínas relacionadas con la ruta hedgehog (por ejemplo, sonic hedgehog, patched y smoothed) y proteosomas.

En una realización preferida, los presentes compuestos pueden combinarse con agentes antineoplásicos (por ejemplo pequeñas moléculas, anticuerpos monoclonales ARN antisentido y proteínas de fusión) que inhiben una o más dianas biológicas tales como Zolanza, Tarceva, Iressa, Tykerb, Gleevec, Sutent, Sprycel, Nexavar, Sorafinib, CNF2024, RG108, BMS387032, Affinitak, Avastina, Herceptina, Erbitux, AG24322, PD325901, ZD6474, PD184322, Obatodax, ABT737, GDC-0449, IPI-926, BMS833923, LDE225, PF-04449913 y AEE788. Estas combinaciones pueden aumentar la eficacia terapéutica sobre la eficacia que se logra por cualquiera de los agentes solos y puede prevenir o retardar la aparición de variantes mutacionales resistentes.

En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos abarcan un amplio intervalo de tratamientos terapéuticos en el campo de la oncología. Estos agentes se administran en diversos estadios de la enfermedad con el propósito de encoger tumores, destruir células de cáncer remanentes que quedan después de cirugía, inducir remisión, mantener la remisión y/o aliviar los síntomas referentes al cáncer o su tratamiento. Los ejemplos de estos agentes incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes tales como derivados de gas de mostaza (Mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, melfalán, ifosfamida), etileniminas (tiotepa, hexametilmelanina), alquilsulfonatos (Busulfán), Hidrazinas y Triazinas (Altretamina, Procarbazina, Dacarbazina y Temozolomida), Nitrosoureas (Carmustina, Lomustina y Estreptozocina), Ifosfamida y sales de metal (Carboplatino, Cisplatino y Oxaliplatino); alcaloides de plantas tales como Podofilolotoxinas (Etopósido y Tenipósido), Taxanos (Paclitaxel y Docetaxel), alcaloides de Vinca (Vincristina, Vinblastina, Vindesina y Vinorelbina), y análogos de camptotecán (Irinotecán y Topotecán); antibióticos anti-tumorales tales como Cromomicinas (Dactinomicina y Plicamicina), Antraciclinas (Doxorubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Mitoxantrona, Valrubicina e Idarubicina), y antibióticos misceláneos tales como Mitomicina, Actinomicina y Bleomicina; anti-metabolitos tales como antagonistas de ácido fólico (Metotrexato, Pemetrexed, Raltitrexed, Aminopterina), antagonistas de pirimidina (5-Fluorouracilo, Floxuridina, Citarabina, Capecitabina y Gemcitabina), antagonistas de purina (6-Mercaptopurina y 6-Tioguanina) e inhibidores de adenosina desaminasa (Cladribina, Fludarabina, Mercaptopurina, Clofarabina, Tioguanina, Nelarabina y Pentostatina); inhibidores de topoisomerasa tales como inhibidores de topoisomerasa I (Irinotecán, topotecán) e inhibidores de topoisomerasa II (Amsacrina, etopósido, etopósido fosfato, tenipósido); anticuerpos monoclonales (Alemtuzumab, Gemtuzumab, ozogamicina, Rituximab, Trastuzumab, Ibritumomab Tioxetan, Cetuximab, Panitumumab, Tositumomab, Bevacizumab); y anti-neoplásicos misceláneos tales como inhibidores de ribonucleótido reductasa (Hidroxiurea); inhibidor esteroide adrenocortical (Mitotano); enzimas (Asparaginasa y Pegaspargasa); agentes anti-microtúbulos (Estramustina); retinoides (Bexaroteno, Isotretinoína, Tretinoína (ATRA), y Lenalidomida.

En ciertas realizaciones preferidas, los compuestos de la invención se administran en combinación con un agente quimioprotector. Los agentes quimioprotectores actúan para proteger el cuerpo o minimizar los efectos secundarios de la quimioterapia. Los ejemplos de estos agentes incluyen, pero no están limitados a, amfostina, mesna y dexrazoxano.

En un aspecto de la invención, los presentes compuestos se administran en combinación con terapia de radiación. La radiación comúnmente se suministra en forma interna (implante de material radioactivo cerca del sitio de cáncer) o externamente desde una máquina que emplea radiación de fotones (rayos x o rayos gamma) o partículas. Cuando la terapia de combinación además comprende tratamiento de radiación, el tratamiento de radiación puede llevarse a cabo en cualquier tiempo conveniente siempre que se logre un efecto beneficioso de la co-acción de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento de radiación. Por ejemplo, en casos apropiados, el efecto beneficioso todavía se logra cuando el tratamiento de radiación se eliminó temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, probablemente durante días o incluso semanas.

Se apreciará que los compuestos de la invención pueden emplearse en combinación con un agente

inmunoterapéutico. Una forma de inmunoterapia es la generación de una respuesta inmune específica de tumor sistémica activa con origen en el huésped mediante la administración de una composición de vacuna en un sitio distante del tumor. Diversos tipos de vacunas se han propuesto, incluyendo vacunas de antígeno tumoral aislado y vacunas de anti-idiotipo. Otro enfoque es utilizar células de tumor del sujeto a tratar, o un derivado de estas células (revisado por Schirmacher *et al.* (1995) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 12 1:487). En la Pat. U.S. No. 5.484.596, Hanna Jr. *et al.* reivindican un método para tratar un carcinoma reseccionable para prevenir la recurrencia o metástasis, que comprende retirar quirúrgicamente el tumor, dispersar las células con colagenasa, irradiar las células y vacunar al paciente con al menos tres dosis consecutivas de aproximadamente  $10^7$  células.

Se apreciara que los compuestos de la invención pueden emplearse ventajosamente conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adyuvantes. Los ejemplos de agentes convenientes para terapia adyuvante incluyen un agonista  $5HT_1$ , tal como triptano (por ejemplo, sumatriptano o naratriptano); un agonista de adenosina A1; un ligando EP; un modulador NMDA, tal como un antagonista de glicina; un bloqueador de canal sodio (por ejemplo, lamotrigina); un antagonista de sustancia P (por ejemplo, un antagonista de  $NK_1$ ); un canabinoide; acetaminofeno o fenacetina; un inhibidor de 5-lipoxigenasa; un antagonista del receptor de leucotrieno; un DMARD (por ejemplo, metotrexato); gabapentina y compuestos relacionados; un antidepresivo tricíclico (por ejemplo, amitriptilina); una fármaco antiepiléptico estabilizante de neuronas; un inhibidor de la captación mono-aminérgica (por ejemplo, venlafaxina); un inhibidor de metaloproteínasa de matriz; un inhibidor de óxido nítrico sintasa (NOS), tal como un iNOS o un inhibidor nNOS; un inhibidor de la liberación, o acción, de factor  $\alpha$ . de necrosis de tumor; una terapia de anticuerpo, tal como una terapia de anticuerpo monoclonal; un agente antiviral, tal como un inhibidor de nucleósido (por ejemplo, lamivudina) o un modulador del sistema inmune (por ejemplo, interferón); un analgésico opioide; un anestésico local; un estimulante, incluyendo cafeína; un antagonista  $H_2$  (por ejemplo, ranitidina); un inhibidor de bomba de protones (por ejemplo, omeprazol); un antiácido (por ejemplo, hidróxido de aluminio o magnesio); un antiflatulencia (por ejemplo, simeticona); un descongestionante (por ejemplo, fenilefrina, fenilpropanolamina, pseudoefedrina, oximetazolina, epinefrina, nafazolina, xilometazolina, propilhexedrina, o levo-desoxiefedrina); un antitusivo (por ejemplo, codeína, hidrocodona, carmifeno, carbetapentano o dexametorfano); un diurético; o un antihistamínico sedante o no sedante.

Los compuestos también pueden emplearse en el tratamiento de un trastorno que involucra, está relacionado con o asociado con la desregulación de histona desacetilasa (HDAC). Hay varios trastornos que se han implicado con o que se sabe que están mediados al menos en parte por actividad HDAC, en donde la actividad HDAC se sabe que juega un papel en desencadenar el inicio de la enfermedad, o cuyos síntomas se sabe o se ha mostrado que se alivian por inhibidores de HDAC. Los trastornos de este tipo que se esperaría que fueran susceptibles a tratamiento con los compuestos de la invención incluyen los siguientes pero están limitados a: trastornos anti-proliferativos (por ejemplo, cánceres); enfermedades Neurodegenerativas incluyendo Enfermedad Huntington, enfermedad de Poliglutamina, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, Convulsiones, degeneración Nigro-estriada, Parálisis supranuclear Progresiva, distonía de Torsión, Tortícolis espasmódica y disquinesia, temblor Familiar, síndrome de Gilles de la Tourette, enfermedad del cuerpo difuso de Lewy, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, hemorragia intracerebral, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, esclerosis lateral amiotrófica, polineuropatía intersticial hipertrófica, Retinitis pigmentosa, Atrofia óptica hereditaria, paraplejía espástica hereditaria, ataxia progresiva y síndrome de Shy-Drager; enfermedades metabólicas incluyendo diabetes Tipo 2; Enfermedades degenerativas del ojo incluyendo Glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma Rubeótico; enfermedades Inflammatorias y/o trastornos del sistema inmune incluyendo artritis reumatoide (RA), Osteoartritis, artritis crónica juvenil, enfermedad de injerto contra huésped, psoriasis, asma, espondiloartropatía, Enfermedad de Crohn, enfermedad intestinal inflamatoria, Colitis Ulcerosa, hepatitis alcohólica, Diabetes, síndrome de Sjogren, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, glomerulopatía membranosa, dolor discogénico, Lupus Sistémico Eritematoso; Enfermedad que involucra angiogénesis incluyendo cáncer, psoriasis, artritis reumatoide; trastornos psicológicos incluyendo enfermedad bipolar, esquizofrenia, manía, depresión y demencia; Enfermedades cardiovasculares incluyendo la prevención y tratamiento de daño a tejido de miocardio y vascular relacionado con isquemia o relacionado con reperfusión, fallo cardíaco, restenosis y arteriosclerosis; enfermedades fibróticas incluyendo fibrosis del hígado, fibrosis quística y angiofibroma; enfermedades infecciosas incluyendo infecciones fúngicas, tal como candidiasis o *Candida Albicans*, infecciones bacterianas, infecciones virales, tal como Herpes Simple, poliovirus, rinovirus y coxsackievirus, infecciones protozoarias, tales como Malaria, infección de *Leishmania*, infección de *Tripanosoma brucei*, *Toxoplasmosis* y coccidiosis y trastornos hematopoyéticos incluyendo talasemia, anemia y anemia de células falciformes.

Los compuestos de la invención también pueden emplearse en el tratamiento de un trastorno que involucra, está relacionado con, o asociado con la desregulación de PI3 quinasa. La actividad de PI3 quinasa se ha implicado en o se ha mostrado que está involucrada en una variedad de trastornos. En ciertos casos, la actividad PI3 quinasa está involucrada en desencadenar el inicio de la enfermedad, mientras que en otros, se sabe o se ha mostrado que los síntomas se alivian por inhibidores de la actividad PI3 quinasa. Los trastornos de este tipo que se esperaría que fueran susceptibles a tratamiento con los compuestos de la invención, incluyen pero no están limitados a cánceres, incluyendo leucemia, cáncer de la piel, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer gástrico y cáncer de cerebro; restenosis, aterosclerosis, trastornos de huesos, artritis, retinopatía diabética, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, aterosclerosis, inflamación, angiogénesis, trastornos inmunológicos, pancreatitis y enfermedad



de riñón.

En una realización, los compuestos de la invención pueden emplearse para inducir o inhibir la apoptosis, un proceso de muerte celular fisiológica crítico para el desarrollo normal y la homeostasis. Las alteraciones de las rutas apoptóticas contribuyen a la patogénesis de una variedad de enfermedades humanas. Los compuestos de la invención, como moduladores de apoptosis, serán útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades humanas con aberraciones en la apoptosis incluyendo cáncer (particularmente, pero no limitado a, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones en p53, tumores dependientes de hormona de mama, próstata y ovario y lesiones precancerosas tal como poliposis adenomatosa familiar), infecciones virales (incluyendo, pero no limitadas a, virus herpes, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis y adenovirus), enfermedades autoinmunes (incluyendo, pero no limitadas a, lupus sistémico eritematoso, glomerulonefritis mediada por inmunidad, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedades intestinales inflamatorias y diabetes mellitus autoinmune), trastornos neurodegenerativos (incluyendo, pero no limitados a, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar), SIDA, síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, infartos de miocardio asociados con lesión isquémica, derrame cerebral y lesión de reperfusión, arritmia, aterosclerosis, enfermedades de hígado inducidas por toxinas o inducidas por alcohol, enfermedades hematológicas (incluyendo, pero no limitadas a, anemia crónica y anemia aplásica), enfermedades degenerativas del sistema músculo-esquelético (incluyendo, pero no limitadas a, osteoporosis y artritis), rinosinusitis sensible a aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades del riñón y dolor de cáncer.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos de la invención para uso en el tratamiento y/o prevención de la respuesta inmune o respuestas mediadas por inmunidad y enfermedades, tal como la prevención o tratamiento de rechazo después de trasplante de material de injerto orgánico o sintético, células, órganos o tejido para reemplazar todo o parte de la función de tejidos, tales como corazón, riñón, hígado, médula ósea, piel, córnea, vasos, pulmón, páncreas, intestino, extremidad, músculo, tejido nervioso, duodeno, intestino delgado, células de islotes pancreáticos, incluyendo xeno-trasplantes, etc.; para tratar o prevenir la enfermedad injerto contra huésped, enfermedades autoinmunes, tal como artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, esclerosis múltiple, miastenia grave, diabetes tipo I, uveitis, diabetes mellitus de inicio juvenil o de inicio reciente, uveitis, enfermedad de Graves, psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, vasculitis, enfermedades mediadas por auto-anticuerpos, anemia aplásica, síndrome de Evan, anemia hemolítica autoinmune y semejantes; y además para tratar enfermedades infecciosas que provocan respuesta inmune aberrante y/o activación, tales como desregulación inmune inducida por patógeno o traumática, incluyendo por ejemplo, las que son causadas por infecciones de hepatitis B y C, VIH, infección de staphylococcus aureus, encefalitis viral, sepsis, enfermedades parasitarias en donde se induce daño por una respuesta inflamatoria (por ejemplo, lepra); y para prevenir o tratar enfermedades circulatorias, tales como arteriosclerosis, aterosclerosis, vasculitis, poliarteritis nodosa y miocarditis. Además, la presente invención puede emplearse para prevenir/suprimir una respuesta inmune asociada con un tratamiento de terapia génica, tal como la introducción de genes ajenos en células autólogas y expresión del producto codificado. De esta manera, en una realización, la invención se refiere a compuestos para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno de respuesta inmune o una respuesta o trastorno mediado por inmunidad en un sujeto que requiere tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona compuestos de la invención para uso en el tratamiento de una variedad de enfermedades neurodegenerativas, una lista no exhaustiva de la cual incluye: I. Trastornos caracterizados por demencia progresiva en la ausencia de otros signos neurológicos prominentes, tal como enfermedad de Alzheimer; demencia Senil de tipo Alzheimer; y enfermedad de Pick (atrofia lobular); II. Síndromes que combinan demencia progresiva con otras anomalías neurológicas prominentes tales como: A) síndromes que aparecen primordialmente en adultos (por ejemplo, enfermedad de Huntington, atrofia de sistemas múltiples que combina demencia con ataxia y/o manifestaciones de enfermedad de Parkinson, parálisis supranuclear progresiva (Steel-Richardson-Olszewski), enfermedad de cuerpo de Lewy difuso, y degeneración corticodentatonigral; y B) síndromes que aparecen primordialmente en niños o adultos jóvenes (por ejemplo, enfermedad de Hallervorden-Spatz y epilepsia mioclónica familiar progresiva); III. Síndromes de anomalías que se desarrollan gradualmente de postura y movimiento tales como parálisis agitans (enfermedad de Parkinson), degeneración nigroestriada, parálisis supranuclear progresiva, distonía por torsión (espasmo de torsión; distonía musculorum deformans), tortícolis espasmódica y otras disquinesias, temblor familiar, y síndrome de Gilles de la Tourette; IV. Síndromes de ataxia progresiva tales como degeneraciones cerebelares (por ejemplo, degeneración cortical cerebral y atrofia olivopontocerebelar (OPCA)); y degeneración espinocerebelar (ataxia de Friedreich y trastornos relacionados); V. Síndrome de fallo del sistema nervioso autónomo central (síndrome Shy-Drager); VI. Síndromes de debilidad y desgaste muscular sin cambios sensoriales (enfermedad motoneuronal tal como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal (por ejemplo, atrofia muscular espinal infantil (Werdnig-Hoffman), atrofia muscular espinal juvenil (Wohlfart-Kugelberg-Welander) y otras formas de atrofia muscular espinal familiar), esclerosis lateral primaria y paraplejía espástica hereditaria; VII. Síndromes que combinan debilidad y desgaste muscular con cambios sensoriales (atrofia muscular neural progresiva; polineuropatías familiares crónicas) tales como atrofia muscular peroneal (Charcot-Marie-Tooth), polineuropatía intersticial hipertrofica (Dejerine-Sottas), y formas misceláneas de neuropatía progresiva crónica; VIII Síndromes de pérdida visual progresiva tales como degeneración pigmentaria de

la retina (retinitis pigmentosa), y atrofia óptica hereditaria (enfermedad de Leber). Además, los compuestos de la invención pueden estar implicados en la remodelación de la cromatina.

La invención abarca composiciones farmacéuticas que comprenden sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención como se describió anteriormente. La invención también abarca solvatos de los compuestos de la invención y composiciones farmacéuticas que comprenden estos solvatos, tales como hidratos, metanolatos o etanolatos. El término "solvato" se refiere a una forma sólida, de preferencia cristalina, de un compuesto que incluye la presencia de moléculas de disolvente en la red cristalina. Un solvato de un compuesto que comprende un disolvente dado se prepara típicamente por cristalización del compuesto de este disolvente. Los solvatos pueden incluir una variedad de disolventes, incluyendo agua, metanol y etanol. El término "hidrato" se refiere a un solvato en el que el disolvente es agua, e incluye, pero no está limitado a, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato y semejantes. La invención también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier forma física sólida o líquida del compuesto de la invención, incluyendo formas cristalinas y solvato cristalinas. Por ejemplo, los compuestos pueden estar en una forma cristalina, en una forma amorfa y tienen cualquier tamaño de partículas. Las partículas pueden ser micronizadas, o pueden ser aglomeradas, gránulos de partículas, polvos, aceites, suspensiones aceitosas o cualquier otra forma física sólida o líquida.

Los compuestos de la invención, y derivados, fragmentos, análogos, homólogos, sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden ser incorporados en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración, junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los compuestos anteriores, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De preferencia, la cantidad efectiva cuando se trata cáncer, es una cantidad efectiva para inducir selectivamente diferenciación terminal de células neoplásicas convenientes y menos de una cantidad que provoque toxicidad en un paciente.

Los compuestos de la invención pueden administrarse por cualquier medio conveniente, incluyendo, sin limitación, administraciones parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, implante, oral, sublingual, bucal, nasal, pulmonar, transdérmica, tópica, vaginal, rectal y transmucosal o semejantes. La administración tópica también puede involucrar el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforésis. Las preparaciones farmacéuticas incluyen una preparación sólida, semisólida o líquida (comprimido, gránulo, pastilla, cápsula, supositorio, crema, ungüento, aerosol, polvo, líquido, emulsión, suspensión, jarabe, inyección etc.) que contiene un compuesto de la invención como un ingrediente activo, que es adecuado para el modo de administración seleccionado. En una realización, las composiciones farmacéuticas se administran oralmente, y de esta manera se formulan de manera conveniente para administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas convenientes incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pelotitas, sobres y efervescentes, polvos y semejantes. Las formulaciones orales líquidas convenientes incluyen disoluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y semejantes. En una realización de la presente invención, la composición se formula en una cápsula. De acuerdo con esta realización, las composiciones de la presente invención comprenden además del compuesto activo y del vehículo o diluyente inerte, una cápsula de gelatina dura.

Cualquier excipiente inerte que se emplea comúnmente como un vehículo o diluyente podrá emplearse en las formulaciones de la presente invención, tal como por ejemplo una goma, un almidón, un azúcar, un material celulósico, un acrilato o sus mezclas. Un diluyente preferido es celulosa microcristalina. Las composiciones además pueden comprender un agente disgregante (por ejemplo croscarmelosa de sodio) y un lubricante (por ejemplo estearato de magnesio) y pueden comprender adicionalmente uno o más aditivos seleccionados de un aglutinante, un tampón, un inhibidor de proteasa, un surfactante, un agente solubilizante, un plastificante, un emulsionante, un agente estabilizante, un agente que incrementa la viscosidad, un edulcorante, un agente formador de película, o cualquier combinación de los mismos. Además, las composiciones de la presente invención pueden estar en la forma de formulaciones de liberación controlada o liberación inmediata.

Para formulaciones líquidas, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones acuosas o no acuosas, suspensiones, emulsiones o aceites. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilen glicol, polietileno glicol y ésteres orgánicos inyectables tales como etil oleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo disolución salina y medio tamponado. Los ejemplos de aceites son aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de oliva, aceite de girasol y aceite de hígado de pescado. Las disoluciones o suspensiones también pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, disolución salina, aceites no volátiles, polietileno glicoles, glicerina, propileno glicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como bencil alcohol o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o disulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Además, las composiciones adicionalmente pueden comprender aglutinantes (por ejemplo, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa de sodio, crospovidona, goma guar, glicolato sódico de almidón, Primogel), tampones (por ejemplo,

5 tris-HCl., acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Plurónico F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, surfactantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilen glicerol, polietilen glicol), un deslizante (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizantes (por ejemplo, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetil celulosa), agentes que incrementan la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, sacarosa, aspartamo, ácido cítrico), agentes saporíferos (por ejemplo, menta, metil salicilato, o saporífero de naranja), conservantes (por ejemplo, Timerosal, bencil alcohol, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilen glicol, lauril sulfato de sodio), auxiliares de flujo (por ejemplo dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, dietil ftalato, trietil citrato), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropil celulosa, lauril sulfato de sodio), revestimientos de polímero (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes formadores de película y revestimiento (por ejemplo etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes.

15 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán al compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles, biodegradables tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de estas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También puede usarse suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Pat. U.S. No. 4.522.811.

25 Es especialmente ventajoso el formular las composiciones orales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Las formas de dosificación unitaria como se emplea aquí, se refieren a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dicta por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de formulación de este compuesto activo para el tratamiento de individuos.

30 Las formulaciones de la invención pretendidas para administración oral pueden incluir uno o más potenciadores de la permeación, incluyendo ácidos grasos de cadena larga o sales de los mismos, tales como ácido decanoico y decanoato de sodio.

35 En una realización preferida, el compuesto se puede formular en una disolución acuosa para inyección intravenosa. En una realización, pueden emplearse de forma conveniente agentes solubilizantes. Un agente solubilizante particularmente preferido incluye ciclodextrinas y ciclodextrinas modificadas, tales como derivado de  $\beta$ -ciclodextrina derivatizado con sulfobutilo, tal como sulfobutiléter-7- $\beta$ -ciclodextrina que se vende por CyDex, Inc. con la marca registrada CAPTISOL®.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete, o dispensador junto con instrucciones para la administración.

45 La administración diaria puede repetirse continuamente durante un período de varios días a varios años. El tratamiento oral puede continuar durante entre una semana y la vida del paciente. De preferencia, la administración puede llevarse a cabo durante cinco días consecutivos tiempo después del cual el paciente puede ser evaluado para determinar si se requiere administración adicional. La administración puede ser continua o intermitente, por ejemplo, tratamiento durante un número de días consecutivos seguidos por un período de reposo. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma intravenosa el primer día de tratamiento, con administración oral en el segundo día y todos los días consecutivos posteriores.

50 La preparación de las composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo es bien comprendida en la técnica, por ejemplo, por procesos de mezclado, granulación o formación de comprimidos. El ingrediente terapéutico activo a menudo se mezcla con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo. Para administración oral, los agentes activos se mezclan con aditivos usuales para este propósito, tales como vehículos, estabilizantes, o diluyentes inertes, y convertidos por métodos usuales en formas convenientes para administración, tales como comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas de gelatina dura o blanda, disoluciones acuosas, alcohólicas o aceitosas y semejantes como se detalló anteriormente.

55 La cantidad del compuesto administrado al paciente es menos que una cantidad que provocaría toxicidad al paciente. En ciertas realizaciones, la cantidad del compuesto que se administra al paciente es menos que la cantidad que provoca una concentración del compuesto en el plasma del paciente para igualar o exceder el nivel tóxico del compuesto. De preferencia, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 10 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene

a aproximadamente 25 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 50 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 100 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 500 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 1.000 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 2.500 nM. En una realización, la concentración del compuesto en el plasma del paciente se mantiene a aproximadamente 5.000 nM. La cantidad óptima del compuesto que deberá ser administrada al paciente en la práctica de la presente invención dependerá del compuesto particular empleado y del tipo del cáncer a tratar.

## 10 Definiciones

A continuación se listan definiciones de varios términos empleados para describir esta invención. Estas definiciones se aplican a los términos tal y como se emplean a lo largo de esta especificación y reivindicaciones, a menos que se limite de otra forma en instancias específicas, ya sea en forma individual o como parte de un grupo mayor.

El término “acilo” se refiere a hidrógeno, alquilo, cicloalquilo parcialmente saturado o totalmente saturado, heterociclo parcialmente saturado o totalmente saturado, arilo, y grupos carbonilo sustituidos con heteroarilo. Por ejemplo, acilo incluye grupos tales como alcanilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) (por ejemplo, formilo, acetilo, propionilo, butirilo, valerilo, caproilo, t-butilacetilo, etc.), cicloalquil(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)carbonilo (por ejemplo, ciclopropilcarbonilo, ciclobutilcarbonilo, ciclopentilcarbonilo, ciclohexilcarbonilo, etc.), carbonilo heterocíclico (por ejemplo, pirrolidinilcarbonilo, pirrolid-2-onal-5-carbonilo, piperidinilcarbonilo, piperazinilcarbonilo, tetrahidrofuranilcarbonilo, etc.), aroilo (por ejemplo, benzoilo) y heteroarilo (por ejemplo, tiofenil-2-carbonilo, tiofenil-3-carbonilo, furanil-2-carbonilo, furanil-3-carbonilo, 1H-pirroil-2-carbonilo, 1H-pirroil-3-carbonilo, benzo[b]tiofenil-2-carbonilo, etc.). Además, el resto alquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo del grupo acilo puede ser uno cualquiera de los grupos descritos en las definiciones respectivas. Cuando se indica como “opcionalmente sustituido”, el grupo acilo puede estar sin sustituir o estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes (típicamente uno a tres sustituyentes) seleccionados independientemente del grupo de sustituyentes listados a continuación en la definición para “sustituido” o el resto alquilo, cicloalquilo, heterociclo, arilo y heteroarilo del grupo acilo puede estar sustituido como se describió anteriormente en la lista preferida y más preferida de sustituyentes, respectivamente.

El término “alquilo” abarca radicales lineales o ramificados que tienen uno a aproximadamente veinte átomos de carbono o, de preferencia, uno a aproximadamente doce átomos de carbono. Los radicales alquilo más preferidos son radicales “alquilo inferior” que tienen uno a aproximadamente diez átomos de carbono. Los más preferidos son los radicales alquilo inferior que tienen uno a aproximadamente ocho átomos de carbono. Los ejemplos de estos radicales incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, iso-amilo, hexilo y semejantes.

El término “alqueno” abarca radicales lineales o ramificados que tienen al menos un doble enlace carbono-carbono de dos a aproximadamente veinte átomos de carbono o, de preferencia, dos a aproximadamente doce átomos de carbono. Los radicales alqueno más preferidos son radicales “alqueno inferior” que tienen dos a aproximadamente diez átomos de carbono y más preferiblemente aproximadamente dos a aproximadamente ocho átomos de carbono. Los ejemplos de radicales alqueno incluyen etenilo, alilo, propenilo, butenilo y 4-metilbutenilo. Los términos “alqueno” y “alqueno inferior” abarcan radicales que tienen las orientaciones “cis” y “trans”, o alternativamente, las orientaciones “E” y “Z”.

El término “alquino” abarca radicales lineales o ramificados que tienen al menos un triple enlace carbono-carbono de dos a aproximadamente veinte átomos de carbono o, de preferencia, dos a aproximadamente doce átomos de carbono. Los radicales alquino más preferidos son radicales “alquino inferior” que tienen dos a aproximadamente diez átomos de carbono y más preferiblemente aproximadamente dos a aproximadamente ocho átomos de carbono. Los ejemplos de radicales alquino incluyen propargilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butino, 2-butinilo y 1-pentinilo.

El término “arilo”, solo o en combinación, significa un sistema aromático carbocíclico que contiene uno, dos o tres anillos en donde estos anillos pueden estar unidos entre sí en una forma lateral o pueden estar fusionados. El término “arilo” abarca radicales aromáticos tales como fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indano y bifenilo.

Los términos “heterociclilo”, “heterociclo”, “heterocíclico” o “heterociclo” abarcan radicales en forma de anillo que contienen heteroátomo saturado, parcialmente insaturado e insaturado, que también pueden denominarse “heterociclilo”, “heterocicloalqueno” y “heteroarilo” de manera correspondiente, en donde los heteroátomos pueden seleccionarse de nitrógeno, azufre y oxígeno. Los ejemplos de radicales heterociclilo saturados incluyen grupos heteromonocíclicos de 3 a 6 miembros saturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno (por ejemplo, pirrolidinilo, imidazolidinilo, piperidino, piperazinilo, etc.); grupos heteromonocíclicos de 3 a 6 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno (por ejemplo, morfolinilo, etc.); grupos heteromonocíclicos de 3 a 6 miembros saturados que contienen 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno (por ejemplo, tiazolidinilo, etc.). Los ejemplos de radicales heterociclilos parcialmente insaturados incluyen dihidrotiofeno, dihidropirano, dihidrofurano y dihidrotiazol. Los radicales heterociclilo pueden incluir un nitrógeno pentavalente, tal como en los radicales tetrazolio y piridinio. El término “heterociclo” también abarca radicales en donde los radicales

heterociclilo se fusionan con radicales arilo o cicloalquilo. Los ejemplos de estos radicales bicíclicos fusionados incluyen benzofurano, benzotiofeno y semejantes.

El término "heteroarilo" abarca radicales heterociclilo insaturados. Los ejemplos de radicales heteroarilo incluyen grupos heteromonocíclicos de 3 a 6 miembros, preferiblemente 5 ó 6 miembros, insaturados que contienen 1 a 4 átomos de nitrógeno, por ejemplo, pirrolilo, pirrolinilo, imidazolilo, pirazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, triazolilo (por ejemplo, 4H-1,2,4-triazolilo, 1H-1,2,3-triazolilo, 2H-1,2,3-triazolilo, etc.) tetrazolilo (por ejemplo 1H-tetrazolilo, 2H-tetrazolilo, etc.), etc.; grupo heterociclilo condensado insaturado que contiene 1 a 5 átomos de nitrógeno, por ejemplo, indolilo, isoindolilo, indolizínilo, bencimidazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indazolilo, benzotriazolilo, tetrazolopiridazinilo (por ejemplo, tetrazolo[1,5-b]piridazinilo, etc.), etc.; grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros, preferiblemente 5 ó 6 miembros, insaturado que contiene un átomo de oxígeno, por ejemplo, piranilo, furilo, etc.; grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros insaturado que contiene un átomo de azufre, por ejemplo, tienilo, etc.; grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros, preferiblemente 5 ó 6 miembros, insaturado que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno, por ejemplo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo (por ejemplo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, etc.) etc.; grupo heterociclilo condensado insaturado que contiene 1 a 2 átomos de oxígeno y 1 a 3 átomos de nitrógeno (por ejemplo benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, etc.); grupo heteromonocíclico de 3 a 6 miembros, preferiblemente 5 ó 6 miembros, insaturado que contiene 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno, por ejemplo, tiazolilo, tiadiazolilo (por ejemplo, 1,2,4-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, etc.) etc.; grupo heterociclilo condensado insaturado que contiene 1 a 2 átomos de azufre y 1 a 3 átomos de nitrógeno (por ejemplo, benzotiazolilo, benzotiadiazolilo, etc.) y semejantes.

El término "heterocicloalquilo" abarca radicales alquilo sustituidos con heterociclo. Los radicales heterocicloalquilo más preferidos son radicales "heterocicloalquilo inferior" que tienen uno a seis átomos de carbono en los radicales heterociclo.

El término "sustituido" se refiere al reemplazo de uno o más radicales hidrógeno en una estructura determinada con el radical de un sustituyente especificado que incluye, pero no está limitado a: halo, alquilo, alqueno, alquino, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxycarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino, hidroxilo, alcoxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico, y alifático. Debe entenderse que el sustituyente puede estar sustituido adicionalmente.

Para simplificar, los restos químicos se definen y a los que se hace referencia a lo largo de la presente, pueden ser restos químicos univalentes (por ejemplo, alquilo, arilo, etc.) o restos multivalentes bajo las circunstancias estructurales apropiadas claras para los expertos en la técnica. Por ejemplo, un resto "alquilo" puede ser referido a un radical monovalente (por ejemplo  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ ), o en otros casos, un resto conector bivalente puede ser "alquilo" en cuyo caso los expertos en la técnica comprenderán que el alquilo es un radical divalente (por ejemplo,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), que es equivalente al término "alquilenilo". Similarmente, en circunstancias en las que los restos divalentes se requieren y se establecen como "alcoxi", "alquilamino", "ariloxi", "alquiltio", "arilo", "heteroarilo", "heterocíclico", "alquilo", "alqueno", "alquino", "alifático" o "cicloalquilo", los expertos en la técnica comprenderán que los términos "alcoxi", "alquilamino", "ariloxi", "alquiltio", "arilo", "heteroarilo", "heterocíclico", "alquilo", "alqueno", "alquino", "alifático" o "cicloalquilo", se refieren al resto divalente correspondiente.

Los términos "halógeno" o "halo" como se emplean aquí, se refieren a un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

Como se emplea aquí, el término "proliferación aberrante" se refiere a crecimiento celular anormal.

La frase "terapia adyuvante" abarca tratamiento de un sujeto con agentes que reducen o evitan efectos secundarios asociados con la terapia de combinación de la presente invención, incluyendo pero no limitado a, aquellos agentes que, por ejemplo, reducen el efecto tóxico de fármacos anticáncer, por ejemplo, inhibidores de resorción ósea, agentes cardioprotectores; previenen o reducen la incidencia de náusea y vómito asociado con quimioterapia, radioterapia u operación; o reducen la incidencia de infección asociada con la administración de fármacos anticáncer mielosupresores.

El término "angiogénesis", como se emplea aquí, se refiere a la formación de vasos sanguíneos. Específicamente, la angiogénesis es un proceso de múltiples etapas en donde las células endoteliales se degradan de manera focal e invaden a través de su propia membrana basal, migran a través del estroma intersticial hacia un estímulo angiogénico, proliferan próximas a la punta de migración, se organizan en vasos sanguíneos y se vuelven a conectar a membrana basal recientemente sintetizada (ver Folkman *et al.*, Adv. Cancer Res., Vol. 43, p. 175-203 (1985)). Los agentes anti-angiogénicos interfieren con este proceso. Los ejemplos de agentes que interfieren con varias de estas etapas incluyen trombospondina-1, angiostatina, endostatina, interferón alfa y compuestos tales como inhibidores de la metaloproteinasas de matriz (MMP) que bloquean las acciones de enzimas que liberan y crean rutas para vasos sanguíneos de reciente formación a seguir; compuestos, tales como inhibidores  $\alpha.v.\beta.3$ , que interfieren con moléculas que utilizan las células de los vasos sanguíneos para establecer un puente entre un vaso sanguíneo

parental y un tumor; agentes, tales como inhibidores de COX-2 específicos, que evitan el crecimiento de células que forman nuevos vasos sanguíneos; y compuestos basados en proteínas que simultáneamente interfieren con varias de estas dianas.

5 El término "apoptosis" como se emplea aquí, se refiere a muerte celular programada como se señala por los núcleos en células humanas y animales con funcionamiento normal cuando la edad o el estado de salud y condición de la célula lo dictan. Un "agente que induce apoptosis" desencadena el proceso de muerte celular programada.

El término "cáncer" como se emplea aquí, denota una case de enfermedades o trastornos caracterizados por división descontrolada de las células y la capacidad de estas células para invadir otros tejidos, ya sea por crecimiento directo en tejido adyacente a través de invasión o por implante en sitios distantes por metástasis.

10 Los términos "compuesto" y "compuesto de la invención", como se emplean aquí, se refieren a compuestos de Fórmula I y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de la invención pueden obtenerse en diferentes formas, incluyendo formas cristalinas y amorfas. Los compuestos también pueden aparecer como solvatos, por ejemplo, hidratos, o solvatos de un disolvente orgánico, preferiblemente un disolvente farmacéuticamente aceptable. Los compuestos también pueden aparecer en múltiples formas cristalinas, o polimórficas. Los compuestos de la invención incluyen además profármacos y ésteres farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula I.

El término "dispositivo" se refiere a cualquier aparato, usualmente mecánico o eléctrico, diseñado para realizar una función particular.

20 Como se emplea aquí, el término "displasia" se refiere a crecimiento celular anormal, y típicamente se refiere a la forma más temprana de lesión pre-cancerosa reconocible en una biopsia por un patólogo.

25 Como se emplea aquí, el término "cantidad efectiva de los presentes compuestos", con respecto al método de tratamiento presente, se refiere a una cantidad del presente compuesto que, cuando se administra como parte del régimen de dosis deseado, logra, por ejemplo, un cambio en la velocidad de proliferación celular y/o estado de diferenciación y/o proporción de supervivencia de una célula hasta estándares clínicamente aceptables. Esta cantidad además puede aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas de un trastorno de neoplasia, incluyendo, pero no limitado a: 1) reducción en el número de células de cáncer; 2) reducción en el tamaño del tumor; 3) inhibición (es decir, ralentización en cierta medida, de preferencia parada) de la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos; 4) inhibición (es decir, ralentización en cierta medida, de preferencia parada) de metástasis tumoral; 5) inhibición, en cierta medida, del crecimiento del tumor; 6) alivio o reducción en cierta medida de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno; y/o 7) alivio o reducción de los efectos secundarios asociados con la administración de agentes anticancerosos.

El término "hiperplasia", como se emplea aquí, se refiere a división o crecimiento celular excesivos.

35 La frase un "agente inmunoterapéutico" se refiere a agentes empleados para transferir la inmunidad de un donante inmune, por ejemplo, otra persona o un animal, a un huésped por inoculación. El término abarca el uso de suero o gamma globulina que contienen los anticuerpos preformados producidos por otro individuo o un animal; estimulación sistémica no específica; adyuvantes; inmunoterapia específica activa; e inmunoterapia adoptiva. La inmunoterapia adoptiva se refiere al tratamiento de una enfermedad por terapia o agentes que incluyen inoculación de huésped de linfocitos sensibilizados, factor de transferencia, ARN inmune, o anticuerpos en suero o gamma globulina.

40 El término "inhibición", en el contexto de neoplasia, crecimiento de tumor o crecimiento de células tumorales, puede estimarse por la aparición retardada de tumores primarios o secundarios, desarrollo ralentizado de tumores primarios o secundarios, aparición disminuida de tumores primarios o secundarios, severidad ralentizada o disminuida de efectos secundarios de la enfermedad, crecimiento tumoral frenado y regresión de tumores, entre otros. En el extremo, inhibición completa, se refiere aquí como prevención o quimioprevención.

45 El término "metástasis," como se emplea aquí, se refiere a la migración de células cancerosas desde el sitio de tumor original a través de la sangre y vasos linfáticos, para producir cánceres en otros tejidos. La metástasis también es el término empleado para un cáncer secundario que crece en un sitio distante.

El término "neoplasma," como se emplea aquí, se refiere a una masa anormal de tejido que resulta de división celular excesiva. Los neoplasmas pueden ser benignos (no cancerosos), o malignos (cancerosos) y también pueden denominarse un tumor. El término "neoplasia" es el proceso patológico que resulta en formación de tumor.

50 Como se emplea aquí, el término "pre-canceroso" se refiere a una afección que no es maligna, pero que probablemente se vuelva maligna si se deja sin tratar.

El término "proliferación" se refiere a células que experimentan mitosis.

La frase "enfermedad o trastorno relacionado con PI3 quinasa" se refiere a una enfermedad o trastorno caracterizado por actividad inapropiada de fosfoinosítido-3-quinasa o actividad excesiva de fosfoinosítido-3-quinasa.

Una actividad inapropiada se refiere a cualquiera de: (i) expresión de PI3 quinasa en células que normalmente no expresan PI3 quinasa; (ii) expresión incrementada de PI3 quinasa que lleva a proliferación celular indeseada, diferenciación y/o crecimiento; o (iii) expresión disminuida de PI3 quinasa que lleva a reducciones indeseadas en proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular. La sobreactividad de PI3 quinasa se refiere a ya sea  
 5 amplificación del gen que codifica una PI3 quinasa particular o producción de un nivel de actividad PI3 quinasa que puede correlacionarse con un trastorno de proliferación, diferenciación y/o crecimiento celular (esto es, al incrementar el nivel de PI3 quinasa, se incrementa la severidad de uno o más de los síntomas del trastorno celular).

La frase un "agente radio terapéutico" se refiere al uso de radiación electromagnética o de partículas en el tratamiento de neoplasia.

10 El término "recurrencia" como se emplea aquí se refiere al retorno de cáncer después de un periodo de remisión. Esto puede deberse a eliminación incompleta de células del cáncer inicial y puede ocurrir localmente (el mismo sitio de cáncer inicial), en forma regional (en la vecindad del cáncer inicial, posiblemente en los nodos linfáticos o tejido), y/o distante como resultado de metástasis.

15 El término "tratamiento" se refiere a cualquier proceso, acción, aplicación, terapia o semejantes, en donde un mamífero, incluyendo un ser humano, se somete a auxilio médico con el objeto de mejorar la afección del mamífero, en forma directa o indirecta.

El término "vacuna" incluye agentes que inducen al sistema inmune del paciente para preparar una respuesta inmune contra el tumor mediante el ataque a células que expresan antígenos asociados con tumor (Teas).

20 Como se emplea aquí, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuadas para utilizar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin indebida toxicidad, irritación, respuesta alérgica y semejantes, y son proporcionales con una relación razonable de riesgo/beneficio. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge, *et al.*, describe sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los  
 25 compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico o ácido inorgánico conveniente. Los ejemplos de sales de adición de ácido no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido lactobiónico o ácido malónico o al  
 30 utilizar otros métodos empleados en la técnica tales como intercambio de iones. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitadas a, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-  
 35 fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluensulfonato, undecanoato, sales valerato, y semejantes. Las sales de metales alcalinos o alcalino térreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y semejantes. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario, y amina formados utilizando contra-iones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquil sulfonato que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, sulfonato y aril sulfonato. Se ha encontrado que ciertas sales tales como sales básicas de sodio, potasio y colina así como sales ácidas tales como sales sulfato y metanosulfonato mejoran la solubilidad de los compuestos de Fórmula I en medios acuosos farmacéuticamente aceptables. En una realización, la sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1 es la sal de colina. Las sales preferidas del Compuesto 1  
 40 incluyen la sal de sodio y la sal de potasio. Otras sales preferidas incluyen las sales sulfato y metanosulfonato.

Como se emplea aquí, el término "éster farmacéuticamente aceptable" se refiere a ésteres que se hidrolizan *in vivo* e incluyen aquellos que se descomponen fácilmente en el cuerpo humano para dejar al compuesto parental o una sal del mismo. Los grupos éster convenientes incluyen, por ejemplo, aquellos derivados de ácidos carboxílicos alifáticos farmacéuticamente aceptables, particularmente ácidos alcanólicos, alquenoicos, cicloalcanólicos y alcanodioicos, en  
 50 donde cada resto alquilo o alquenoilo no tiene ventajosamente más de 6 átomos de carbono. Los ejemplos de ésteres particulares incluyen, pero no están limitados a, formatos, acetatos, propionatos, butiratos, acrilatos y etilsuccinatos.

La expresión "profármacos farmacéuticamente aceptables" como se emplea aquí, se refiere a aquellos profármacos de los compuestos de la presente invención que son, dentro del alcance del juicio médico razonable, adecuados para utilizar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores con toxicidad, irritación, respuesta alérgica y semejantes no excesiva, proporcional con una relación razonable de riesgo/beneficio, y efectivos para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando sea posible, de los compuestos de la presente invención. "Profármaco", como se emplea aquí, significa un compuesto que es convertible *in vivo* por medios metabólicos (por ejemplo, por hidrólisis) en un compuesto de la invención. Las diversas formas de profármacos se conocen en la técnica, por ejemplo, como se discute en Bundgaard, (ed.), Design of Prodrugs, Elsevier (1985); Widder, *et al.* (ed.), Methods in Enzymology, vol. 4, Academic Press (1985); Krogsgaard-Larsen, *et al.*, (ed.) "Design and Application of  
 60

Prodrugs, Textbook of Drug Design and Development, Capítulo 5, 113-191 (1991); Bundgaard, *et al.*, *Journal of Drug Deliver Reviews*, 8:1-38(1992); Bundgaard, J. *of Pharmaceutical Sciences*, 77:285 et seq. (1988); Higuchi y Stella (eds.) Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems, *American Chemical Society* (1975); y Bernard Testa y Joachim Mayer, "Hydrolysis In Drug And Prodrug Metabolism: *Chemistry, Biochemistry And Enzymology*", John Wiley and Sons, Ltd. (2002).

Como se emplea aquí, "vehículo farmacéuticamente aceptable" se pretende que incluya cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de absorción, y semejantes, compatibles con administración farmacéutica, tal como agua libre de pirógenos estéril. Los vehículos convenientes se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora aquí por referencia. Los ejemplos preferidos de estos vehículos o diluyentes incluyen, pero no están limitados a, agua, disolución salina, disoluciones de Ringer, disolución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. Los liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles también pueden emplearse. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en lo que se refiere a cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Como se emplea aquí, el término "pre-canceroso" se refiere a una afección que no es maligna, pero que probablemente se volverá maligna si se deja sin tratar.

El término "sujeto" como se emplea aquí, se refiere a un animal. De preferencia el animal es un mamífero. Más preferiblemente, el mamífero es un ser humano. Un sujeto también se refiere, por ejemplo, a perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, cobayas, peces, aves y semejantes.

Los compuestos de esta invención pueden ser modificados al agregar funcionalidades apropiadas para aumentar las propiedades biológicas selectivas. Estas modificaciones se conocen en la técnica y pueden incluir aquellas que incrementan la penetración biológica en un sistema biológico determinado (por ejemplo, sangre, sistema linfático, sistema nervioso central), incrementan la disponibilidad oral, incrementan la solubilidad para permitir la administración por inyección, alteran el metabolismo y alteran la velocidad de excreción.

Los compuestos sintetizados pueden separarse de una mezcla de reacción y purificarse adicionalmente por un método tal como cromatografía en columna, cromatografía líquida con alta presión, o recristalización. Como puede apreciarse por el experto en la técnica, serán evidentes para los expertos en la técnica métodos adicionales para la síntesis de los compuestos de las fórmulas de la presente memoria. Adicionalmente, las diversas etapas de síntesis pueden realizarse en secuencia u orden alternos para dar los compuestos deseados. Las transformaciones de química sintética y metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para sintetizar los compuestos aquí descritos, se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y sus ediciones posteriores.

#### Composiciones Farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la presente invención, formulada junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente, el vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable es relleno, diluyente, material encapsulante o auxiliar de formulación no tóxico, inerte, sólido, semi-sólido o líquido, de cualquier tipo. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables son azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; ciclodextrinas tales como alfa- ( $\alpha$ ), beta- ( $\beta$ ) y gamma- ( $\gamma$ ) ciclodextrinas; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa y celulosa acetato; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de azafrán, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilen glicol; ésteres tales como etil oleato y etil laurato; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido alginico; agua libre de pirógenos; disolución salina isotónica; disolución de Ringer; etil alcohol, y disoluciones tamponadas con fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, saporíferos y agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el juicio del formulador.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse en forma oral, parenteral, por pulverización por inhalación, en forma tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o por un reservorio implantado, de preferencia por administración oral o administración por inyección. Las composiciones farmacéuticas de esta



invención pueden contener cualesquiera transportadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos convencionales. En algunos casos, el pH de la formulación puede ajustarse con ácidos, bases o tampones farmacéuticamente aceptables para aumentar la estabilidad del compuesto formulado o su forma de administración. El término parenteral como se emplea aquí, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasnovial, intraesternal, intratecal, intralesión e intracraneal.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes, comúnmente empleados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como etil alcohol, isopropil alcohol, etil carbonato, acetato de etilo, bencil alcohol, bencil benzoato, propilen glicol, 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites (en particular, de semillas de algodón, cacahuete o maní, maíz, germen, aceites de oliva, ricino y sésamo), glicerol, tetrahidrofurfuril alcohol, polietilen glicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saporíferos y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida utilizando agentes de dispersión o humectación convenientes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse están agua, disolución de Ringer, U.S.P. y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites no volátiles estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, cualquier aceite no volátil suave puede emplearse incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se emplean en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes del uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, a menudo es deseable el ralentizar la absorción del fármaco de inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con baja solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución, que, a su vez, puede depender del tamaño de cristal y forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente se logra al disolver o suspender el fármaco en un vehículo graso. Las formas de liberación lenta inyectables se elaboran al formar matrices de microencapsulado del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de fármaco a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de liberación lenta también se preparan al atrapar el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal, de preferencia son supositorios que pueden prepararse al mezclar los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes convenientes tales como manteca de cacao, polietilen glicol o cera de supositorios que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura del cuerpo y por lo tanto se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En estas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o: a) rellenos o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio, e) agentes de retardo de disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, cetil alcohol y glicerol monoestearato, h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilen glicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y sus mezclas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponadores.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina con relleno blando y duro utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar derivada de leche así como polietilen glicoles de alto peso molecular y semejantes.

Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos pueden prepararse con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una

composición que libera el o los ingredientes activos solamente o de forma preferente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, en una forma retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que pueden emplearse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

5 Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, disoluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla bajo condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualesquiera conservantes o tampones requeridos, según se necesite. La formulación oftálmica, gotas para oídos, ungüentos para ojos, polvos y disoluciones también se contemplan dentro del alcance de esta invención.

10 Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilén glicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o sus mezclas.

15 Los polvos o pulverizaciones pueden contener, además de los compuestos de esta invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones adicionalmente pueden contener propulsores usuales tales como clorofluorohidrocarburos.

20 Los parches transdérmicos tienen la ventaja agregada de proporcionar la administración controlada de un compuesto al cuerpo. Estas formas de dosificación pueden elaborarse al disolver o dispensar el compuesto en el medio adecuado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para incrementar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse ya sea proporcionando una membrana que controla la velocidad o dispersando el compuesto en un gel o matriz de polímero.

25 Para la administración pulmonar, una composición terapéutica de la invención se formula y administra al paciente en forma de partículas sólidas o líquidas por administración directa (por ejemplo, inhalación en el sistema respiratorio). Las formas de partículas sólidas o líquidas del compuesto activo preparado para practicar la presente invención, incluyen partículas de tamaño respirable: esto es, partículas de un tamaño suficientemente pequeño como para pasar a través de la boca y laringe después de la inhalación y hacia los bronquios y alvéolos de los pulmones. Se conoce en la técnica la administración de agentes terapéuticos en aerosol, particularmente antibióticos en aerosol (ver, por ejemplo la Pat. U.S. No. 5.767.068 otorgada a VanDevanter *et al.*, Pat. U.S. No. 5.508.269 otorgada a Smith *et al.*, y WO 98/43650 por Montgomery, todas las cuales se incorporan aquí por referencia). Una discusión de administración pulmonar de antibióticos también se encuentra en la Pat. U.S. No. 6.014.969, incorporada aquí por referencia.

30 Por una "cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la invención, se entiende una cantidad del compuesto que confiere un efecto terapéutico en el sujeto tratado, en una proporción razonable de riesgo/beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medido por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de o siente un efecto). Una cantidad efectiva del compuesto descrito anteriormente puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/Kg a aproximadamente 500 mg/Kg, de preferencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/Kg. Las dosis efectivas también variarán dependiendo de la ruta de administración, así como la posibilidad de uso conjunto con otros agentes. Se entenderá sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención, será decidido por el médico a cargo dentro del alcance del juicio médico razonable. El nivel de dosis terapéuticamente efectiva específico para cualquier paciente particular, dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; la hora de administración, ruta de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos empleados en combinación o contemporáneamente con el compuesto específico empleado; y factores semejantes bien conocidos en las técnicas médicas.

35 La dosis diaria total de los compuestos de esta invención administradas a un ser humano u otro animal en dosis únicas o divididas puede ser en cantidades, por ejemplo, de 0,01 a 50 mg/kg de peso corporal o más usualmente de 0,1 a 25 mg/kg de peso corporal. Las composiciones de dosis únicas pueden contener dichas cantidades o submúltiplos de las mismas para constituir la dosis diaria. En general, los regímenes de tratamiento de acuerdo con la presente invención comprenden la administración a un paciente que requiere de este tratamiento de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1.000 mg del o de los compuestos de esta invención por día en dosis únicas o múltiples.

40 Los compuestos de las fórmulas aquí descritas pueden, por ejemplo, ser administrados por inyección, en forma intravenosa, intraarterial, subdérmica, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea; o en forma oral, bucal, nasal, transmucosal, tópica, en una preparación oftálmica, o por inhalación, con una dosificación en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal, alternativamente dosificaciones entre 1 mg y 1.000 mg/dosis, cada 4 a 120 horas, o de acuerdo con los requerimientos del fármaco particular. Los métodos de la presente contemplan la administración de una cantidad efectiva de compuesto o composición de compuesto, para lograr el efecto deseado o establecido. Típicamente, las composiciones farmacéuticas de esta invención se

5 administrarán de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 veces por día o alternativamente, como una infusión continua. Dicha administración puede emplearse como una terapia crónica o aguda. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con excipientes o vehículos farmacéuticamente para producir una forma de dosificación única, variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Una preparación típica contendrá de aproximadamente 5% a aproximadamente 95% de compuesto activo (p/p). Alternativamente, dichas preparaciones pueden contener de aproximadamente 20% a aproximadamente 80% de compuesto activo.

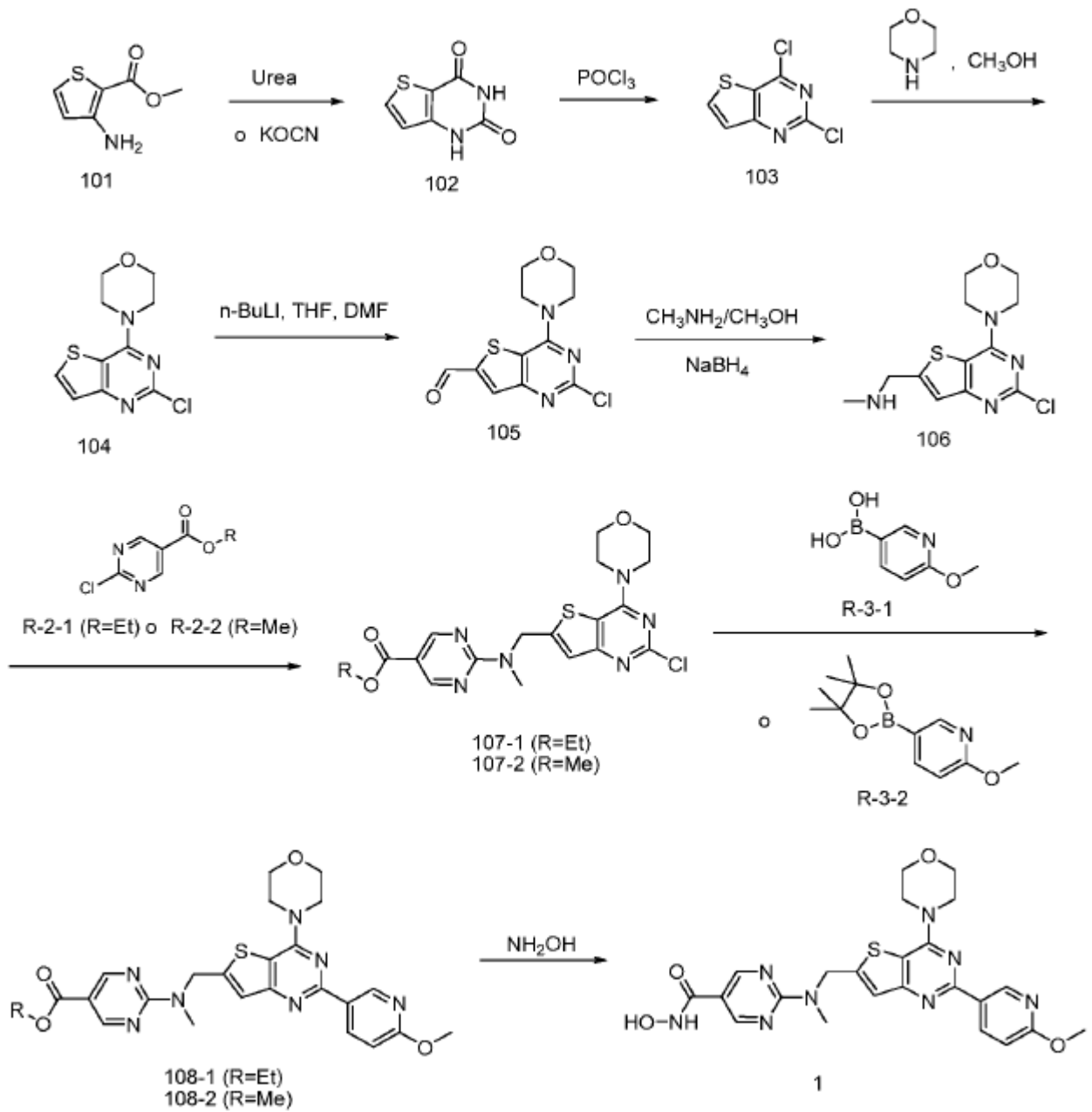
10 Pueden requerirse dosis menores o superiores de aquellas descritas anteriormente. Los regímenes de dosificación y tratamiento específicos para cualquier paciente particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo, dieta, hora de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y curso de la enfermedad, afección o síntomas, la disposición del paciente a la enfermedad, afección o síntomas, y el criterio del médico a cargo.

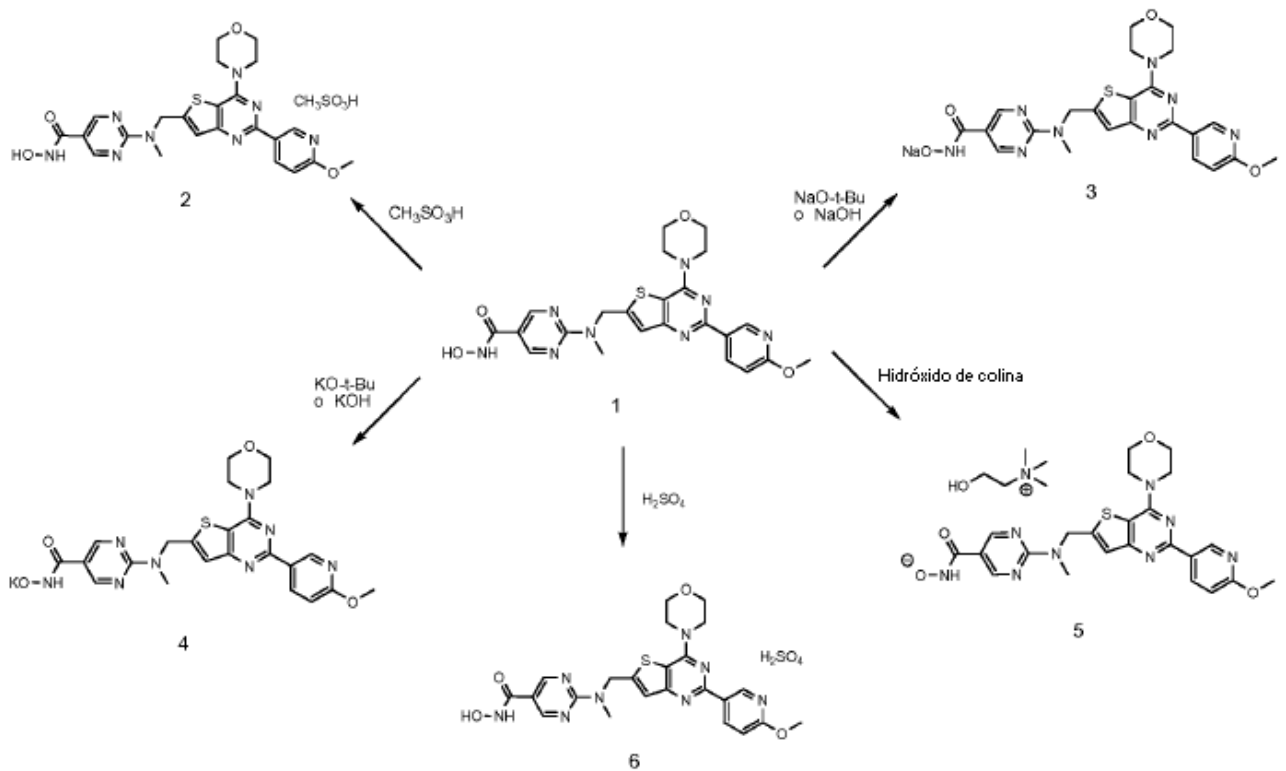
15 Después de mejorar la afección de un paciente, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención, de ser necesario. Subsecuentemente, la dosificación o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse como una función de los síntomas, hasta un nivel en el cual se retiene la afección mejorada cuando los síntomas se han aliviado hasta el nivel deseado. Los pacientes, sin embargo, pueden requerir tratamiento intermitente en una base a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

#### EJEMPLOS

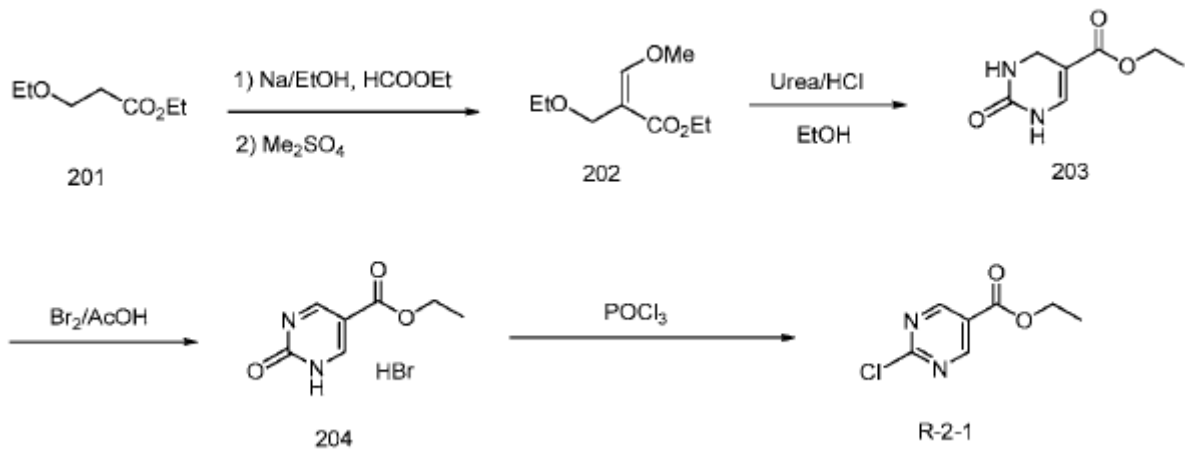
20 Los compuestos y procesos de la presente invención se comprenderán mejor en conexión con los siguientes ejemplos, que se pretenden como una ilustración solamente y no limitante del alcance de la invención. Varios cambios y modificaciones de las realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica y estos cambios y modificaciones incluyendo, sin limitación, aquellos relacionados con las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, formulaciones y/o métodos de la invención pueden hacerse sin alejarse del espíritu de la invención y el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

25 La síntesis del Compuesto 1 y las sales metanosulfonato, de sodio, potasio y colina del mismo de ilustra en los esquemas siguientes.

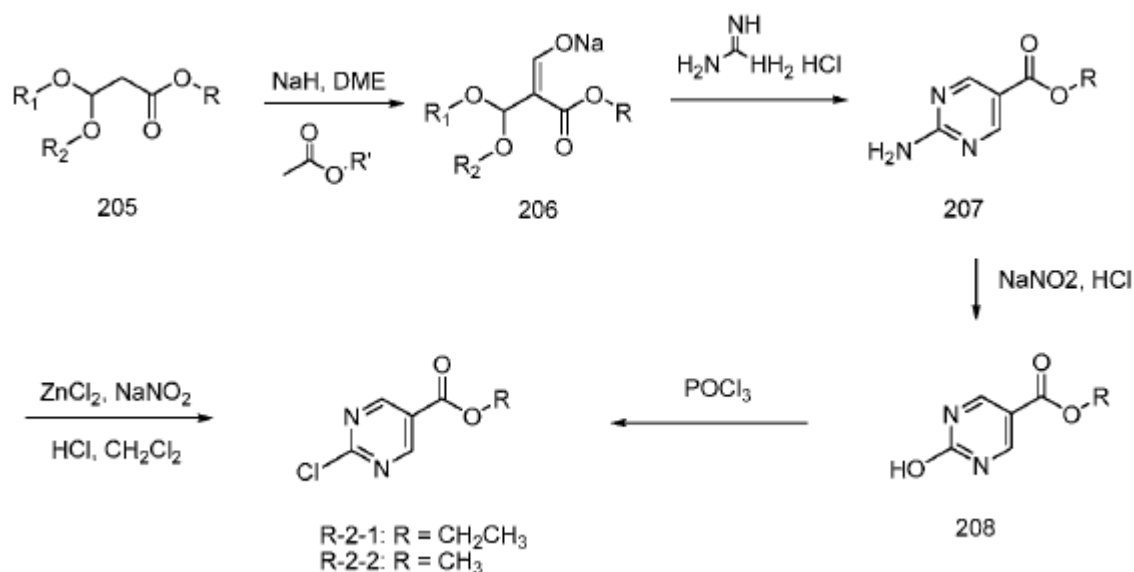




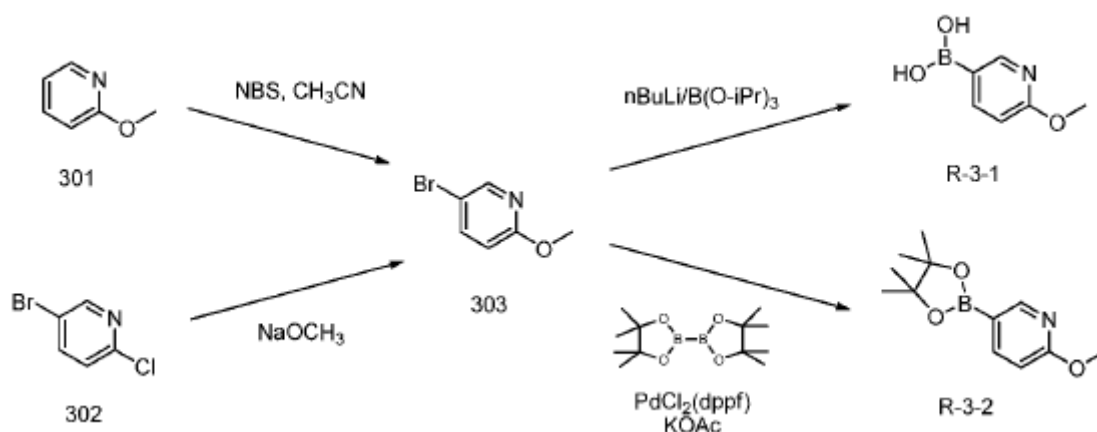
El intermedio 107-1 ó 107-2 se puede preparar haciendo reaccionar 106 bien con R-2-1 o R-2-2, respectivamente. Los esquemas sintéticos para la síntesis de R-2-1 y R-2-2 se ilustran a continuación:



5 O por un método alternativo:



El intermedio 108-1 y 108-2 se puede preparar por la reacción de acoplamiento de 107-1 ó 107-2 bien con R-3-1 o R-3-2, donde R-3-1 y R-3-2 se pueden preparar de acuerdo con el esquema siguiente:



5

### EJEMPLO 1: Preparación de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 1)

#### Etapas a: (Z)-Etil-2-(etoximetil)-3-metoxiacrilato (Compuesto 202)

Se añadió sodio (40,9 g, 1,78 moles) a etanol (750 mL) en partes cuidadosamente y la disolución se concentró para proporcionar NaOEt en polvo después de que desapareciera todo el sodio metal. Con agitación, se añadió hexano (1,0 L) y la mezcla se enfrió en un baño de hielo-agua. Se añadió una mezcla de 201 (130 g, 0,89 moles) y formato de etilo (131 g, 1,78 moles) gota a gota a 0-5°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió sulfato de dimetilo (224 g, 1,78 moles) gota a gota con enfriamiento de baño de hielo-agua. La mezcla resultante se calentó a 50°C durante 2 h. A la mezcla se añadió cloruro de trietilamonio (122 g) e hidróxido de sodio (20 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y se filtró. El filtrado se lavó con agua y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se concentró para rendir el compuesto del título (140 g, 37%) como un aceite incoloro que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional.

#### Etapas b: 2-Oxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo (Compuesto 203)

Una mezcla de compuesto 202 (140 g, 0,745 moles), urea (40,0 g, 0,697 moles) y ácido clorhídrico concentrado (34 mL) en etanol (500 mL) se calentó a reflujo toda la noche. Después de evaporar ~50% del volumen de reacción, la suspensión resultante se filtró, se lavó con una pequeña cantidad de etanol, y se secó para proporcionar compuesto 203 (47 g, 37%) como un sólido blanco. LCMS: 171 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,19 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 3,92 (s, 2H), 4,08 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 7,0 (s, 1H), 7,08 (d, J = 6,0 Hz, 1H), 8,83 (d, br, J = 4,8 Hz, 1H).

**Etapa c:** 2-Oxo-1,2-dihidropirimidina-5-carboxilato de etilo (Compuesto 204)

A una disolución de compuesto 203 (47 g, 280 mmoles) en ácido acético (500 mL) se añadió bromo (49,0 g, 307 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 h, se enfrió hasta temperatura ambiente, se enfrió adicionalmente a 0-5°C y se filtró para proporcionar el compuesto del título 204 como un sólido amarillo (38 g, 54%). LCMS: 169 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 1,28 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 4,32 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 9,00 (br, s, 2H).

**Etapa d:** 2-Cloropirimidina-5-carboxilato de etilo (Compuesto R-2-1)

Una mezcla de compuesto 204 (38,0 g, 153 mmoles) y tricloruro de fosforilo (300 mL) y N,N-dimetilanilina (3 mL) se calentó a reflujo durante 2 h, se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. El residuo se paró cuidadosamente con hielo-agua, se ajustó el pH a 7-8 con carbonato de sodio y se extrajo con EtOAc. Los orgánicos combinados se lavaron con hielo-agua y salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se evaporaron, y se purificaron por cromatografía en columna (eluida con EtOAc/Hexanos, 10%) para rendir compuesto R-2-1 (15 g, 52%) como un sólido blanco. LCMS: 187 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,36 (t, J = 7,5 Hz, 3H), 4,39 (q, J = 7,5 Hz, 2H), 9,08 (s, 2H).

**Etapa e:** (Z)-2-(Dimetoximetil)-3-metoxi-3-oxoprop-1-en-1-olato de sodio (Compuesto 206)

Una mezcla de NaH (27 g, 60% en aceite mineral, 0,675 moles) en 1,2-dimetoxietano anhidro (300 mL) se calentó hasta 40-50°C y se añadió 3,3-dimetoxi propionato de metilo (205) (100 g, 0,675 moles) gota a gota. La mezcla resultante se agitó durante 0,5 h y se añadió formato de metilo anhidro (81 g, 1,35 moles) gota a gota a 40-50°C. La mezcla resultante se agitó a 40-50°C (temperatura interna) durante 2 h antes de enfriarla hasta 0°C. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta 25°C lentamente y se agitó toda la noche. Se añadió Et<sub>2</sub>O (150 mL) y se agitó durante 30 min. La suspensión resultante se filtró. El sólido se lavó con Et<sub>2</sub>O (100 mL), se recogió y se secó para rendir el compuesto del título 206 (82 g, 61%) como un sólido blanquecino. LCMS (m/z): 130,8 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HRMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3,36 (s, 6H), 3,60 (s, 3H), 5,34 (s, 1H), 8,92 (s, 1H).

**Etapa f:** Éster metílico del ácido 2-amino-pirimidina-5-carboxílico (Compuesto 207)

A una mezcla de hidrocloreuro de guanidina (42,2 g, 0,44 moles) en DMF (300 mL) se añadió el compuesto 206 (80 g, 0,40 moles). La mezcla resultante se calentó a 100°C durante 1 h. La mezcla de reacción se filtró antes de enfriarla. La torta del filtro se lavó con 50 mL de DMF y el filtrado combinado se concentró para dejar un residuo que se suspendió en EtOH frío y se lavó con EtOH frío (50 mL) para rendir el compuesto 207 (38 g, 61,5%) como un sólido amarillo. LCMS (m/z): 154,2 [M+1]<sup>+</sup>, 195,1[M+42]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 3,88 (s, 3H), 8,77 (s, 2H).

**Etapa g:** 2-Cloropirimidina-5-carboxilato de metilo (Compuesto R-2-2)

Se añadió compuesto 207 (7 g, 0,046 moles) a una mezcla de ácido clorhídrico concentrado (15,2 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). Después de enfriar, se añadió ZnCl<sub>2</sub> (18,6 g, 0,138 moles) a 15-20°C. La mezcla se agitó a 15-20°C durante 0,5 h y se enfrió hasta 5-10°C. Se añadió NaNO<sub>2</sub> (9,5 g, 0,138 moles) por partes mientras se mantenía la temperatura interna 5-10°C. La reacción se continuó durante ~ 2 h. La mezcla de reacción se vertió en hielo-agua (50 mL). La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL\*2). Los extractos orgánicos combinados se concentraron para rendir producto crudo (4,2 g). El compuesto crudo se suspendió en hexano (20 mL), se calentó a 60°C durante 30 minutos y se filtró. El filtrado se concentró para rendir el compuesto del título R-2-2 (3,5 g, 44,4%) como un sólido blanquecino. LCMS (m/z): 214,1[M+42]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HRMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,00 (s, 3H), 9,15 (s, 2H).

**Etapa h:** 5-Bromo-2-metoxipiridina (Compuesto 303)

Una disolución de 2-metoxi-piridina (100 g, 0,92 moles), NBS (180 g, 1,0 mol) en acetonitrilo (1,0 L) se agitó a reflujo durante 21 h. La TLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se concentró. Se recogieron ~ 900 ml de disolvente. La suspensión resultante se filtró y se lavó con n-hexano (~ 400 mL). El filtrado se concentró de nuevo para rendir producto crudo. El producto crudo se destiló a presión reducida (30°C/~ 0,3 mmHg) para rendir el compuesto del título como un aceite claro (146 g, 84%). LCMS (m/z): 190,0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 3,90 (s, 3H), 6,65 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,62 (dd, J = 8,8 Hz, 2,4Hz, 1H), 8,19 (s, 1H).

**Etapa i:** Ácido 6-metoxipiridin-3-ilborónico (R-3-1):

A una disolución de compuesto 303 (20 g, 0,11 moles) en THF anhidro (180 ml) se añadió gota a gota n-BuLi (59 mL, 2M en THF) a -78°C, la mezcla resultante se agitó durante 1 h. Se añadió borato de triisopropilo (37 mL) a -78°C y la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se continuó agitando toda la noche. La TLC (hexanos/acetato de etilo =5:1) mostró que la reacción se había completado. La mezcla se ajustó el pH a 3-4 con 4N HCl (90 ml). El precipitado se recogió por filtración para rendir compuesto crudo R-3-1 (21 g, 128%). El compuesto crudo R-3-1 (21 g) se disolvió en agua (200 ml) y la disolución se ajustó el pH a 8-9 con disolución concentrada de amoníaco, el precipitado se recogió por filtración para rendir el compuesto del título puro R-3-1 como un sólido blanco (11 g, 67%). LCMS (m/z): 154,1 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,86 (s, 3H), 6,76 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,99 (dd, J = 8,4 Hz, 2,0 Hz, 1H), 8,05 (br, 2H), 8,52 (d, J = 2,0 Hz, 1H).

**Etapa j:** 2-metoxi-5-(4,4,5,5,-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridina (Compuesto R-3-2)

Una mezcla de compuesto 303 (55 g, 0,29 moles), 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-bi(1,3,2-dioxaborolano) (90 g, 0,35 moles), acetato de potasio (57 g, 0,58 moles) y cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (2,2 g, 3 mmoles) en dioxano anhidro (500 mL) se calentó a 108°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> toda la noche. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna eluida con hexanos/acetato de etilo para rendir compuesto del título R-3-2 (58 g, 84 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1,30 (s, 12H), 3,88 (s, 3H), 6,81 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 7,88 (dd, *J* = 8,0 Hz, 2,0Hz, 1H), 8,41 (d, *J* = 2,0Hz, 1H).

**Etapa k:** Tieno[3,2-*d*]pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (Compuesto 102)

**Método de urea:** Una mezcla de 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (101) (90,0 g, 573 mmoles, 1,0 eq) y urea (277,6 g, 4,6 moles, 8,0 eq) se calentó a 190°C durante 3-4 h y se enfrió hasta temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se añadió NaOH ac. (10%, 800 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 h, el sólido de retiró por filtración. El filtrado se acidificó con HCl hasta pH 3-4, el sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó *in vacuo* para proporcionar el producto deseado, compuesto 102 como un sólido blanquecino (87 g, 89%). p.f.:280-285°C. LCMS (m/z): 169,0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,92 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,05 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 11,0-11,5 (br, 2H).

**Método de KOCN:** A una mezcla de 3-aminotiofeno-2-carboxilato (101) (100,0 g, 636,9 mmoles, 1,0 eq), ácido acético (705 mL) y agua (600 mL) se añadió una disolución de cianato de potasio (154,8 g, 1,91 moles, 3,0 eq) en agua (326 mL) lentamente durante un periodo de 1 h. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, se filtró y se lavó con agua (500 mL). La torta se cargó en un reactor de tamaño adecuado y se añadió disolución acuosa 2 M de hidróxido de sodio (1,65 L), la suspensión de sólidos se agitó durante 2 h y la LCMS confirmó la formación del producto deseado. La mezcla se enfrió hasta 10°C y se añadió ácido clorhídrico acuoso 3 M (1,29 L) hasta que el pH = 5,0 ~ 6,0. La suspensión de sólidos se filtró, se lavó con agua (700 mL), y se secó en horno en vacío a 50°C durante 24 h para rendir compuesto 102 (100 g, 94%) como un sólido blanquecino. LCMS (m/z): 169,1 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6,92 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,04 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 11,14 (s, 1H), 11,51 (s, 1H).

**Etapa l:** 2,4-Diclorotieno[3,2-*d*]pirimidina (Compuesto 103)

Se añadió oxiclóruo de fósforo (152 mL, 1,67 moles, 7,0 eq) lentamente a la disolución enfriada de compuesto 102 (40 g, 238 mmoles, 1,0 eq) y N,N-dimetilanilina (22,5 mL, 179 mmoles, 0,75 eq) en acetonitrilo (250 mL) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 20°C. La mezcla se calentó hasta 85°C y se agitó durante 24 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta 15°C, y se vertió lentamente en una mezcla de hielo y agua fría (360 mL). La suspensión de sólidos resultante se filtró, se lavó con agua fría (200 mL). La torta se secó en horno en vacío a 40°C durante 24 h para rendir compuesto 103 (40,5 g, 83%) como un sólido blanquecino. P.f.:245-250°C. LCMS (m/z): 205,0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 7,75 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,71 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H).

**Etapa m:** 2-Cloro-4-morfolinotieno[3,2-*d*]pirimidina (Compuesto 104)

A una mezcla de compuesto 103 (34,2 g, 167 mmoles, 1,0 eq) y metanol (500 mL) se añadió morfolina (31,2 mL, 367 mmoles, 2,2 eq) lentamente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. El precipitado se recogió por filtración, se lavó con metanol y se secó *in vacuo* para proporcionar el producto deseado, compuesto 104 como un sólido amarillo claro (39 g, 91%). P.f.: 250-255°C. LCMS (m/z): 256,0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,76 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 3,92 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 7,42 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 8,32 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H).

**Etapa n:** 2-Cloro-4-morfolinotieno[3,2-*d*]pirimidina-6-carbaldehído (Compuesto 105)

A una suspensión de compuesto 104 (20 g, 78,4 mmoles, 1,0 eq) en THF (anhidro, 320 mL) a -78°C se añadió n-BuLi (en hexanos, 2,4 M, 40,8 mL, 102 mmoles, 1,3 eq) lentamente bajo nitrógeno. La suspensión de sólidos resultante se dejó calentar hasta -60°C para convertirse en una disolución marrón clara. La mezcla de reacción se enfrió hasta -78°C de nuevo y se añadió DMF (anhidro, 9,1 mL, 118 mmoles, 1,5 eq) lentamente. La disolución resultante se agitó a -78°C durante 0,5 h, se calentó hasta 0°C durante 1 h y se vertió lentamente en una mezcla de HCl ac. (0,25 M, 660 mL) y agua helada (320 mL). La suspensión de sólidos resultante se agitó a 0-10°C durante 0,5 h, se filtró, se lavó con agua fría y se secó *in vacuo* para rendir compuesto 105 como un sólido amarillo (22 g, 98%). P.f.:260-265°C. LCMS (m/z): 284,0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,77 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 3,96 (t, *J* = 5,2 Hz, 4H), 8,30 (s, 1H), 10,21 (s, 1H).

**Etapa o:** (2-Cloro-4-morfolin-4-il-tieno[3,2-*d*]pirimidin-6-ilmetil)-metil-amina (Compuesto 106)

A una disolución de compuesto 105 (20,0 g, 70,4 mmoles, 1,0 eq) en metanol (125 mL) se añadió disolución de metilamina en metanol (27% v/v, 75 mL, 563,2 mmoles) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche y el disolvente se eliminó *in vacuo* para proporcionar un producto sólido crudo, que se disolvió en metanol (550 mL) y THF (220 mL) bajo nitrógeno. Se añadió borohidruro de sodio (8 g,



211,2 mmoles) por partes y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se evaporó *in vacuo* y se añadió agua (300 mL). La mezcla acuosa se extrajo con cloruro de metileno y los extractos combinados se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron. El residuo se disolvió en 6M HCl (230 mL) y se agitó durante 30 min. La disolución acuosa se lavó con cloruro de metileno varias veces, y se ajustó a pH 9-10 con NaOH (4N). El sólido precipitado se recogió por filtración y se secó (60°C, 6h) para proporcionar un sólido amarillo claro (18 g, 85%). P.f.: 240-245°C. LCMS (m/z): 299 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 2,32 (s, 3H), 3,74 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,88 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,96 (s, 2H), 7,24 (s, 1H).

**Etapas p(a):** Éster etílico del ácido 2-[(2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno[3,2-d]pirimidin-6-ilmetil)-metil-amino]-pirimidina-5-carboxílico (Compuesto 107-1)

- 10 A una mezcla de 106 (10 g, 33,6 mmoles) y R-2-1 (6,8 g, 36,4 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN (400 mL) a temperatura ambiente se añadió diisopropiletilamina (220 mL, 1,26 moles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla se evaporó y se siguió por la adición de cloruro de metileno (300 mL). La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró *in vacuo* para dejar un residuo. Al residuo se añadió acetato de etilo y la mezcla resultante se agitó a temperatura de baño de hielo/agua durante 50 min. El sólido resultante se recogió por filtración para proporcionar el producto del título 107-1 como un sólido blanco (10,6 g, 70%). LCMS: 449 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,30 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 3,25 (s, 3H), 3,71 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,83 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 4,29 (m, 2H), 5,21 (s, 2H), 7,39 (s, 1H), 8,87 (s, 2H).

**Etapas p(b):** Éster metílico del ácido 2-[(2-cloro-4-morfolin-4-il-tieno[3,2-d]pirimidin-6-ilmetil)-metil-amino]-pirimidina-5-carboxílico (Compuesto 107-2)

- 20 Una mezcla de compuesto 106 (25 g, 84 mmoles), CH<sub>3</sub>CN (500 mL) y R-2-2 (16 g, 92 mmoles) se agitó a temperatura ambiente. Se añadió diisopropiletilamina (DIPEA) (500 mL, 2,9 moles). La disolución se agitó toda la noche y se evaporó. Después de añadir cloruro de metileno (500 mL), la fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró *in vacuo*. Al residuo se añadió acetato de etilo (200 mL) y la mezcla se agitó en un baño de hielo/agua durante 50 min. El producto del título se recogió como un sólido blanco (29,4 g, 81%). LCMS (m/z): 435,2 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HRMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 3,25 (s, 3H), 3,71 (t, J = 5,2 Hz, 4H), 3,82-3,84 (m, 7H), 5,21 (s, 2H), 7,39 (s, 1H), 8,87 (s, 2H).

**Etapas q(a):** 2-(((2-(6-Metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxilato de etilo (Compuesto 108-1)

- 30 Método A: Una mezcla de compuesto 107-1 (12 g, 26,7 mmoles), R-3-1 (4,9 g, 32 mmoles), NaHCO<sub>3</sub> (6,7 g, 80,1 mmoles) y cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (188 mg, 0,267 mmoles) en una mezcla de disolventes de tolueno (80 ml), etanol (50 ml) y agua (10 ml) se calentó a 108°C durante 4,5 h bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La TLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se añadió agua (20 ml). El sólido resultante se recogió por filtración y se suspendió en etanol (100 mL). La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se filtró. El sólido recogido se lavó con etanol y se secó *in vacuo* para rendir el compuesto del título 108-1 como un sólido blanco (10 g, 72%).

Método B: Una mezcla de compuesto 107-1 (1,5 g, 3,34 mmoles), R-3-2 (1,6 g, 6,68 mmoles), NaHCO<sub>3</sub> (0,84 g, 10,0 mmoles) y cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (118 mg, 0,167 mmoles) en una mezcla de disolventes de tolueno (24 ml), etanol (15 ml), y agua (3 ml) se calentó a 108°C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> toda la noche. La mezcla de reacción se repartió entre diclorometano y agua. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó *in vacuo* para proporcionar un residuo que se purificó por cromatografía en columna eluida con hexanos/acetato de etilo para rendir compuesto 108-1 como un sólido blanco (1,7 g, 98%).

p.f. 198-202°C. LCMS: 522,30 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 1,31 (t, J = 7,2 Hz, 3H), 3,28 (s, 3H), 3,76 (t, J = 4,4 Hz, 4H), 3,93 (t, J = 4,4 Hz, 4H), 3,94 (s, 3H), 4,30 (q, J = 7,2 Hz, 2H), 5,24 (s, 2H), 6,92 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 8,57 (dd, J = 8,8 Hz, 2,0Hz, 1H), 8,88 (s, 2H), 9,15 (d, J = 2,0 Hz, 1H).

- 45 **Etapas q(b):** 2-(((2-(6-Metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxilato de metilo (Compuesto 108-2)

- A una mezcla de compuesto 107-2 (20 g, 46,0 mmoles), B-3-1 (9,2 g, 60,2 mmoles, 1,3 eq.) en dioxano (540 mL) a temperatura ambiente se añadió NaHCO<sub>3</sub> sólido (11,6 g, 138,1 mmoles, 3 eq.) seguido de la adición de agua (40 mL). La mezcla resultante se desgasificó pasando N<sub>2</sub> a través de la superficie de la disolución. Se añadió cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II) (323 mg, 0,46 mmoles, 0,01eq.) y la mezcla resultante se calentó a 108°C durante 15h. La TLC y LCMS mostraron que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite mientras todavía estaba caliente (>90°C) y se lavó con dioxano (70 mL). El filtrado se enfrió gradualmente hasta temperatura ambiente y se formaron cristales blancos finos durante el periodo de enfriamiento. La suspensión se filtró y se lavó con dioxano (80 mL) para rendir el compuesto del título 108-2 como un sólido blanco (18 g, 78%). LCMS (m/z): 508,3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 3,28 (s, 3H), 3,76 (t, J = 4,8 Hz, 4H), 3,82 (s, 3H); 3,92 (m, 4H), 3,93 (s, 3H), 5,20 (s, 2H), 6,91 (d, J = 8,8Hz, 1H), 7,47 (s, 1H), 8,57 (dd, J = 8,8Hz, 2,4Hz, 1H), 8,88 (s, 2H), 9,15 (d, J = 2,0Hz, 1H).

**Etapar:** N-Hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 1)

Preparación de la disolución de hidroxilamina en metanol

5 Una mezcla de  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (80 g, 1,12 moles) en MeOH (400 mL) se calentó a 60-65°C durante 1h para formar una disolución clara. Se enfrió en un baño de hielo-agua. A la mezcla fría se añadió una disolución de KOH (96 g, 1,68 moles) en MeOH (240 mL) gota a gota mientras se mantenía la temperatura de la reacción a 0-10°C. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos y se filtró a través de un embudo a presión constante relleno con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (700 g). El filtrado se recogió bajo un baño de hielo y se guardó en nevera para uso futuro.

Preparación del Compuesto 1 a partir del compuesto 108-1

10 Se suspendió el compuesto 108-1 (10 g, 19 mmoles) en la disolución de hidroxilamina en metanol anterior recién preparada (1,79M, 350 ml). A esta mezcla se añadió diclorometano (100 mL). El matraz de reacción se selló y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 h antes de volverse una disolución clara. La reacción se agitó durante 9 h. adicionales y se filtró para eliminar cualquier sólido insoluble. El filtrado se ajustó a pH 6-7 con la adición de ácido acético para formar un precipitado sólido. El sólido se recogió por filtración y se lavó con agua y una cantidad mínima de metanol, se secó *in vacuo* a 60°C durante 5h para rendir el compuesto 1 como un sólido blanco (9,2 g, 96%). p.f. 177-180°C. LCMS: 509,3  $[\text{M}+1]^+$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3,24 (s, 3H), 3,76 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 3,92 (t,  $J = 5$  Hz, 4H), 3,92 (s, 3H), 5,20 (s, 2H), 6,90 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,44 (s, 1H), 8,57 (dd,  $J = 8,8$  Hz, 2,4Hz, 1H), 8,75 (s, 2H), 9,01 (s, 1H), 9,14 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 11,08 (s, 1H).

Preparación del Compuesto 1 a partir del compuesto 108-2

20 A una suspensión de compuesto 108-2 (31 g, 61,1 mmoles) en diclorometano (310 mL) a temperatura ambiente se añadió la disolución de hidroxilamina en metanol anterior recién preparada (1,79M, 744 ml). El matraz de reacción se selló y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La mezcla de reacción se volvió una disolución clara. La disolución de reacción se filtró para eliminar cualquier sólido insoluble. Al filtrado se añadió agua (310 mL) y no se formó ningún sólido durante la adición. Se añadió ácido acético (18,5 mL) para ajustar el pH a 10,20 (monitorizado continuamente por medidor de pH) mientras se agitaba. No hubo ningún cambio en la temperatura interna durante la adición de ácido acético. La mezcla de reacción resultante se continuó agitando durante otras 4 h. Gradualmente, se formó un sólido blanco. La suspensión se filtró y se lavó con una cantidad mínima de metanol (100mL x 3). El sólido blanco recogido se re-suspendió en metanol (620 mL) y agua (124 mL) para formar una suspensión. A la suspensión anterior se añadió ácido acético adicional (11 g) para ajustar el pH a 5-6. Se observó el cambio de la forma sólida. La suspensión se continuó agitando durante otras 2 h y se filtró a través de papel de filtro y se lavó con una cantidad mínima de metanol (100 mL x 3). El sólido blanco recogido se secó en horno (50°C) durante 12 h para rendir el Compuesto 1 del título como un sólido blanco (23,6 g, 76,0%). p. f.: 255-259°C. LCMS (m/z): 509,3  $[\text{M}+1]^+$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3,24 (s, 3H), 3,76 (t,  $J = 5,2$  Hz, 4H), 3,92 (t,  $J = 5,2$ Hz, 4H), 3,92 (s, 3H), 5,20 (s, 2H), 6,91 (d,  $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,45 (s, 1H), 8,57 (dd,  $J = 8,4$ Hz, 2,4Hz, 1H), 8,75 (s, 2H), 9,07 (s, 1H), 9,14 (d,  $J = 2,4$ Hz, 1H), 11,14 (s, 1H).

**EJEMPLO 2: Preparación de metanosulfonato de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno [3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 2)**

40 Método A: A una mezcla de Compuesto 1 (300 mg, 0,59 mmoles) y MeOH/ $\text{Et}_2\text{O}$  (3/1, 40 mL) se añadió una disolución de ácido metanosulfónico (114 mg, 1,18 mmoles) en MeOH (3 mL) a 0°C. La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 3 h. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con  $\text{Et}_2\text{O}$  para rendir el Compuesto 2 como un sólido blanco (260 mg, 73%).

45 Método B: A una suspensión de Compuesto 1 (1,5 g, 2,95 mmoles) en diclorometano/MeOH (40 mL / 10 mL) se añadió ácido metanosulfónico (341 mg, 3,55 mmoles) en 2 mL de MeOH a temperatura ambiente (15°C) para formar una disolución clara. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción todavía era clara. Se añadió acetato de etilo (40 mL) a la mezcla y se continuó agitando durante 3 h a temperatura ambiente. El precipitado resultante se recogió por filtración para rendir Compuesto 2 como un sólido blanco (1,45 g, 83%).

50 p.f.: 179-185°C. LCMS: 509,3  $[\text{M}+1]^+$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  2,35 (s, 3H), 3,26 (s, 3H), 3,78 (t,  $J = 9,6$  Hz, 4H), 3,95 (s, 3H), 4,03 (t,  $J = 9,2$  Hz, 4H), 5,24 (s, 2H), 6,99 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,50 (s, 1H), 8,54 (dd,  $J = 8,8$  Hz, 2,4 Hz, 1H), 8,76 (s, 2H), 9,12 (d,  $J = 2,4$  Hz, 1H), 11,11 (br, 1H).

**EJEMPLO 3: Preparación de sal de sodio de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 3)**

55 A una suspensión de Compuesto 1 (300 mg, 0,59 mmoles) en metanol (30 mL) a 0°C se añadió lentamente t-BuONa (85 mg, 0,88 mmoles). La mezcla resultante se calentó hasta temperatura ambiente y se continuó agitando durante 2 h. La reacción se concentró y el residuo se trituró y se lavó con etanol seguido de filtración para rendir Compuesto 3 como un sólido blanco (230 mg, 73%). p.f.: 178-183°C. LCMS: 509,3  $[\text{M}+1]^+$ .  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3,17

(s, 3H), 3,75 (s, 4H), 3,92 (s, 7H), 5,16 (s, 2H), 6,90 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,42 (s, 1H), 8,57 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 8,65 (s, 2H), 9,14 (s, 1H).

**EJEMPLO 4: Preparación de sal de potasio de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 4)**

5 A una mezcla de Compuesto 1 (400 mg, 0,78 mmoles) en metanol (50 mL) se añadió *t*-BuOK (132 mg, 1,17 mmoles) a 0°C bajo N<sub>2</sub>. La mezcla se agitó a 0°C durante 1h y se continuó agitando a temperatura ambiente durante 1,5h. El sólido insoluble se eliminó por filtración y el filtrado se enfrió hasta -20°C. Se añadió Et<sub>2</sub>O (100 mL) al filtrado. La mezcla resultante se agitó a -20°C durante 1h. Se añadieron hexanos (70 mL) y la mezcla se continuó agitando a -20°C durante 2h. El sólido se recogió por filtración y se secó *in vacuo* para rendir Compuesto 4 como un sólido blanco (150 mg, 35%). p.f.: 174-179°C. LCMS: 509,3[M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,16 (s, 3H), 3,74-3,76 (m, 4H), 3,90-3,93 (m, 7H), 5,15 (s, 2H), 6,90 (d,  $J = 8,4$ Hz, 1H), 7,43 (s, 1H), 8,39 (br, 1H), 8,58 (d,  $J = 8,8$ Hz, 1H), 8,62 (s, 2H), 9,15 (s, 1H).

**EJEMPLO 5: Preparación de sal de colina de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 5)**

15 A una disolución de Compuesto 1 (200 mg, 0,39 mmoles) en DCM/MeOH (60 mL/12 mL) se añadió hidróxido de colina (106 mg, 0,39 mmoles, 45% en MeOH). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se concentró para eliminar ~ 30 mL del disolvente. Se añadió acetato de etilo (60 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Después de producirse una pequeña cantidad de precipitación, la mezcla se concentró para eliminar ~ 40 mL del disolvente y se añadió acetato de etilo adicional (60 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h y se filtró para rendir Compuesto 5 como un sólido blanco (180 mg, 76%). p.f.: 181-185°C. LCMS: 509,3[M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,11 (s, 9H), 3,17 (s, 3H), 3,40 (t,  $J = 4,8$ Hz, 2H), 3,75 (t,  $J = 4,8$ Hz, 4H), 3,84 (br, 2H), 3,90-3,93 (m, 7H), 5,15 (s, 2H), 6,89 (d,  $J = 8,8$ Hz, 1H), 7,41 (s, 1H), 8,57 (dd,  $J = 8,8$ Hz, 2,4Hz, 1H), 8,64 (s, 2H), 9,14 (d,  $J = 2,0$ Hz, 1H).

**EJEMPLO 6: Preparación de sulfato de N-hidroxi-2-(((2-(6-metoxipiridin-3-il)-4-morfolinotieno[3,2-d]pirimidin-6-il)metil)(metil)amino)pirimidina-5-carboxamida (Compuesto 6)**

25 A una suspensión de Compuesto 1 (200 mg, 0,39 mmoles) en DCM/MeOH (30 mL/7,5 mL) se añadió ácido sulfúrico (77 mg, 0,79 mmoles, en 1 mL de MeOH) para formar una disolución clara. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se produjo la precipitación y se añadió terc-butil metil éter (60 mL). La mezcla resultante se continuó agitando durante 1 h a temperatura ambiente. El sólido se recogió por filtración para rendir Compuesto 6 como un sólido blanco (180 mg, 76%). P.f.: 243-246°C. LCMS: 509,3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3,26 (s, 3H), 3,78 (t,  $J = 4,8$  Hz, 4H), 3,96 (s, 3H), 4,03 (t,  $J = 4,4$  Hz, 4H), 5,24 (s, 3H), 6,98 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,50 (s, 1H), 8,54 (dd,  $J = 8,8$  Hz, 2,4 Hz, 1H), 8,76 (s, 2H), 9,12 (d,  $J = 2,0$  Hz, 1H), 11,06 (br, 1H).

**Ejemplo 7: Ensayo de actividad PI3 quinasa**

35 Los ensayos siguientes se usaron para determinar la capacidad del Compuesto 1 para inhibir varias isoformas y mutantes de PI3K.

PI3K $\alpha$

40 La actividad de PI3K $\alpha$  se midió utilizando un ensayo de quinasa luminiscente ADP-Glo. PI3K $\alpha$ , un complejo de p110 $\alpha$  humana de longitud íntegra recombinante etiquetada con GST N-terminal y p85 $\alpha$  humana de longitud íntegra recombinante sin etiquetar se coexpresaron en un sistema de expresión celular Sf9 infectado con Baculovirus. (No. de Acceso GenBank para p110 $\alpha$ , U79143; para p85 $\alpha$ , XM\_043865). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad en una etapa utilizando glutatión-agarosa. Se realizó un ensayo de competencia para medir la cantidad de ADP generado a partir de ATP en la presencia de PI3K $\alpha$  purificado recombinante (p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$ ). PI3K  $\alpha$  se incubó con 20  $\mu$ M sustrato PIP2 en el tampón de reacción (HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Naortovanadato 3 $\mu$ M, DTT 1 mM, ATP ultra puro 10  $\mu$ M y DMSO 0,5%) durante 30 minutos a 30°C. El ADP generado en la reacción se midió por el ensayo ADP-Glo. El ensayo se realizó en dos etapas; en primer lugar, un volumen igual del Reactivo ADP-GLO™ (Promega) se añadió para terminar la reacción de la quinasa y deplecionar el ATP remanente. En la segunda etapa, se añadió el Reactivo de Detección de Quinasa, que convierte simultáneamente ADP a ATP. El ATP recién sintetizado se midió utilizando la reacción acoplada luciferasa/luciferina. La CI<sub>50</sub> determinada para el Compuesto 1 en este ensayo fue menor de 100 nM.

50 La capacidad del Compuesto 1 para inhibir los mutantes de PI3K $\alpha$  H1047R y E545K también se determinó utilizando el procedimiento general descrito anteriormente. La CI<sub>50</sub> determinada para ambos mutantes fue menor de 100 nM.

PI3K $\beta$

55 Se midió la actividad de PI3K $\beta$  utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia en tiempo resuelto (TR-FRET) utilizando tecnología de fluorescencia en tiempo resuelto homogénea (HTRF). PI3K $\beta$ , un complejo de p110 $\beta$  humana de longitud íntegra recombinante etiquetado con histidina N-terminal y p85 $\alpha$  humana de

longitud íntegra recombinante no etiquetado fueron coexpresados en un sistema de expresión celular Sf21 infectado con Baculovirus (No. de Acceso GenBank para p110 $\beta$ , NM\_006219; para p85 $\alpha$ , XM\_043865). Las proteínas se purifican por cromatografía de afinidad de una etapa utilizando glutatión-agarosa. Se realiza un ensayo de competencia para medir la cantidad de PIP3 generado a partir de PIP2 en la presencia de PI3K $\beta$  purificado recombinante (p110 $\beta$ /p85 $\alpha$ ). PI3K $\beta$  se incubó con 10  $\mu$ M sustrato PIP2 en el tampón de reacción (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 2 mM, ATP 10  $\mu$ M y DMSO 1%) durante 30 minutos a 30°C. El producto de reacción después se mezcló con una proteína detectora de PIP3, anticuerpo etiquetado con europio, sonda PIP3 etiquetada con biotina y estreptavidina etiquetada con alofocianina. Se forma un complejo sensor para generar una señal TR-FRET estable en la mezcla de reacción. Esta intensidad de señal disminuye conforme se desplaza la unión de la sonda marcada con biotina al detector de PIP3 por PIP3 producido por la actividad enzimática y se incrementa la cantidad de sonda PIP3 etiquetada con biotina no ligada en la mezcla. La señal TR-FRET se determinó utilizando lector de microplacas con sustracción de fondo.

La CI<sub>50</sub> determinada para el Compuesto 1 en este ensayo fue entre 100 y 1.000 nM.

#### PI3K $\delta$

La actividad de PI3K $\delta$  se midió utilizando un ensayo de polarización de fluorescencia. PI3K $\delta$ , un complejo de p110 $\delta$  humana de longitud íntegra recombinante etiquetado con histidina N-terminal y p85 $\alpha$  humana de longitud íntegra recombinante no etiquetado se coexpresaron en un sistema de expresión celular Sf9 infectado con Baculovirus. (No. de Acceso GenBank para p110 $\delta$ , NM\_005026). Las proteínas se purifican por cromatografía de afinidad en una etapa utilizando glutatión-agarosa. Se realizó un ensayo de competencia para medir la cantidad de PIP3 generado a partir de PIP2 en la presencia de PI3K $\delta$  purificado recombinante (p110 $\delta$ /p85 $\alpha$ ). PI3K $\delta$  se incubó con 10  $\mu$ M sustrato PIP2 en el tampón de reacción (HEPES 20 mM (pH 7,5), NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 2 mM, ATP 10  $\mu$ M y DMSO 1%) durante 1 hora a 30°C. El producto de reacción después se mezcló con una proteína detectora de PIP3 y la sonda de PIP3 fluorescente. Los valores de polarización (mP) disminuyen conforme el enlace de la sonda fluorescente al detector PIP3 se desplaza por PIP3 producido por actividad enzimática y aumenta la cantidad de sonda fluorescente no ligada en la mezcla. El valor de grados de polarización (mP) se determinó utilizando lector de microplacas con sustracción de fondo.

La CI<sub>50</sub> determinada para el Compuesto 1 en este ensayo fue menor de 100 nM.

#### PI3K $\gamma$

La actividad de PI3K $\gamma$  se midió utilizando un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia en tiempo resuelto (TR-FRET) empleando tecnología de fluorescencia en tiempo resuelto homogénea (HTRF). PI3K $\delta$  humana y etiquetada con histidina N-terminal se expresó en un sistema de expresión celular Sf9 infectado con Baculovirus. (Acceso GenBank AF327656). Las proteínas se purifican por cromatografía de afinidad en una etapa utilizando glutatión-agarosa. Se realizó un ensayo de competencia para medir la cantidad de PIP3 generado a partir de PIP2 en la presencia de PI3K $\gamma$  (p120 $\gamma$ ) recombinante purificado. PI3K $\gamma$  (2 nM) se incubó con 10  $\mu$ M sustrato PIP2 en el tampón de reacción (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 2 mM, ATP 10  $\mu$ M y DMSO 1%) durante 30 minutos a 30°C. El producto de reacción después se mezcló con una proteína detectora de PIP3, anticuerpo etiquetado con europio, sonda PIP3 etiquetada con biotina y estreptavidina etiquetada con alofocianina. Se forma un complejo sensor para generar una señal TR-FRET estable en la mezcla de reacción. Esta intensidad de señal disminuye conforme la unión de la sonda etiquetada con biotina al detector de PIP3 se desplaza por PIP3 producido por actividad enzimática y aumenta la cantidad de sonda PIP3 etiquetada con biotina no ligada en la mezcla. La señal TR-FRET se determinó utilizando lector de microplacas con sustracción de fondo.

La CI<sub>50</sub> determinada para el Compuesto 1 en este ensayo fue entre 100 y 1.000 nM.

#### **Ejemplo 8: Ensayo de actividad HDAC**

La actividad inhibitoria de HDAC se estimó utilizando el sistema Biomol Color de Lys (AK-500, Biomol, Plymouth Meeting, PA). Brevemente, extractos nucleares de células HeLa se emplearon como una fuente de HDACs. Diferentes concentraciones de los compuestos de prueba se diluyeron de manera seriada en dimetilsulfóxido (DMSO) y se añadieron a extractos nucleares de células HeLa en la presencia de un sustrato artificial colorimétrico. La condición de ensayo final contenía Tris/Cl 50 mM, pH 8,0, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente (25°C) durante 1 hora antes de la adición de revelador para la terminación. Se mide la actividad enzimática relativa en el lector de microplacas WALLAC Victor II 1420, como intensidad de fluorescencia (excitación: 350-380 nm; emisión: 440-460 nm). Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism (v4.0a) con un ajuste de curva de dosis-respuesta sigmoidal para el cálculo de la CI<sub>50</sub>. La CI<sub>50</sub> determinada para el Compuesto 1 en este ensayo fue menor de 100 nM.

También se determinaron las actividades del Compuesto 1 frente a isotipos de HDAC. Los ensayos de especificidad de HDAC se realizaron en BPS Bioscience (San Diego, CA), siguiendo su procedimiento de operación estándar. Brevemente, las enzimas purificadas etiquetadas con flag (HDAC-1 humana), NCOR2 (HDAC3 humana), GST (HDAC4, 6, 7, 10 y 11 humanas) o His (HDAC 2, 5, 8 y 9 humanas) se expresaron en células de insecto Sf9 y se purificaron antes del uso. El sustrato utilizado para HDAC1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 11 fue el Sustrato 3 de HDAC

desarrollado por BPS Bioscience. Para las demás enzimas HDAC, se usó el sustrato Clase 2a de HDAC. Todas las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en duplicado a 37°C durante 30 minutos, excepto el ensayo de la enzima HDAC11, que se levó a cabo a temperatura ambiente durante 3 horas.

5 La tabla siguiente muestra los resultados para cada una de las HDAC 1-11, con valores  $CI_{50}$  proporcionados como sigue: I > 1.000 nM; 100 nM < II < 1.000 nM; 10 nM < III < 100 nM; IV < 10 nM.

HDAC	1	2	3	8	4	5	6	7	9	10	11
$CI_{50}$	IV	IV	IV	II	II	II	III	II	II	IV	IV

### Ejemplo 9: Ensayo de proliferación celular

10 Las líneas de células de cáncer humano se adquirieron en American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se sembraron a 5.000 a 10.000 por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos con medio de cultivo, como sugiere el proveedor. Las células se incubaron con compuestos a varias concentraciones durante 72 horas en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 0,5% (v/v). La inhibición del crecimiento Se tiene acceso a inhibición de crecimiento por ensayo de contenido de trifosfato de adenosina (ATP) usando el kit CellTiter-Glo de Promega. El kit CellTiter-Glo de Promega es un sistema de de supervisión de ATP con base en luciferasa de luciérnaga. Brevemente, se añadieron 16  $\mu$ l de disolución de lisis de células de mamífero y sustrato a 84  $\mu$ l de medio de cultivo por pocillo para lisar las células y estabilizar el ATP. La mezcla se agitó y se incubó durante 30 minutos y posteriormente se midió la luminiscencia. Los valores  $CI_{50}$  se calcularon utilizando software PRISM (Software GraphPad) con un ajuste de curva de dosis-respuesta sigmoïdal.

20 La Tabla 1 muestra la actividad antiproliferativa en estos ensayos basados en células del Compuesto 1 y los compuestos de referencia SAHA, GDC-0941 y la combinación de SAHA y GDC-0941. En estos ensayos, se utilizó la gradación siguiente: I > 10.000 nM, 10.000 nM  $\geq$  II  $\geq$  1.000 nM, 1.000 nM > III  $\geq$  100 nM, 100 nM > IV  $\geq$  10 nM, y V < 10 nM para  $CI_{50}$ .

Tabla 1

Tipo de Cáncer Línea de Células		SAHA	GDC-0941	SAHA/ GDC-0941	Comp 1
Colon	WiDr	II	I	III	IV
	HCT116	II	II	III	V
	SW403	II	I	II	V
	SW620	II	I	III	V
	SWI-116	II	I	II	V
	T-84	II	II	III	IV
NSCLC	H358	II	II	II	V
	H292	II	II	III	V
	H2122	II	II	III	V
	H460	I	I	II	IV
	A549	II	II	II	IV
	Calu6	II	I	II	IV
Páncreas	MiaPaca2	II	I	II	IV
	CaPan2	II	I	III	IV
	CFPAC-1	II	I	II	IV
	PANC-1	II	II	II	IV
	SW1990	II	I	II	V
Mama	HCC1500	II	I	II	V
	HCC1806	II	I	II	IV
	MDA-MB-231	II	I	II	IV
	SKBr3	II	I	II	IV
	BT474	II	III	III	V
	MDA-MB-361	II	III	IV	V
	UACC-893	II	II	III	IV
	MDA-MB-453	III	III	III	V
	MCF-7	II	III	III	V
	T47D	II	I	III	IV
	ZR-75-1	II	III	II	IV
	MDA-MB-468	II	III	II	IV
ALL	MOLT-4	III	III	III	V
	SUP-B15	III	II	III	V

Tipo de Cáncer Línea de Células		SAHA	GDC-0941	SAHA/ GDC-0941	Comp 1
AML	HL-60	III	III	III	V
	U937	III	II	III	V
	THP-1	I	II	III	IV
	MV-4-11	III	II	III	V
Linfoma de Células B	Pfeiffer	II	III	III	V
	Raji	II	I	II	IV
	RL	III	II	III	V
	DOHH2	III	IV	IV	V
	Granta 519	II	I	III	V
	Su-DHL4	II	III	III	V
Linfoma de Células T	Daudi	II	I	III	IV
	HH	III	III	III	V
	MJ	III	I	III	V
CML	HuT78	IV	III	IV	V
	K562	II	II	III	IV
Mieloma Múltiple	MEG-01	II	I	II	V
	RPMI-8226	II	I	III	V
	OPM-2	III	IV	III	V
	ARH77	II	I	III	V

#### Ejemplo 10: Formulaciones del Compuesto 1

a. Compuesto 1 en Captisol al 30% (10 mg/mL):

5 A un vial que contiene el compuesto 1 (10 mg) se añadió Captisol al 30% (0,937 ml). La mezcla se sonicó durante 2 min. A la mezcla se añadió hidróxido de sodio (1 N, 39,3 µl, 2 eq.) y se sonicó/agitó con vórtex para proporcionar una disolución clara (pH = 12). La disolución se ajustó a pH = 10 con ácido clorhídrico (1 N, 23,6 µl, 1,2 eq.).

b. Compuesto 1 en Captisol al 30% (7,5 mg/mL):

10 A un vial que contiene el compuesto 1 (7,5 mg) se añadió Captisol al 30% (0,941 ml). La mezcla se sonicó durante 2 min. A la mezcla se añadió hidróxido de sodio (1 N, 29,5 µl, 2 eq.) y se sonicó/agitó con vórtex para proporcionar una disolución clara (pH = 12). La disolución se ajustó a pH = 5 con ácido clorhídrico (1 N, 29,5 µl, 2 eq.).

c. Compuesto 1 en C10/PEG1450/PEG400 (5 mg/mL):

A un vial que contiene el compuesto 1 (5 mg), decanoato de sodio (20 mg), PEG400 (40 µl), y PEG1450 (40 mg) se añadió H<sub>2</sub>O (0,88 ml) y NaOH (1 N, 24,6 µl, 2,5 eq.). La mezcla se sonicó y se agitó con vórtex para proporcionar una disolución clara que se ajustó a pH = 10 con HCl (1 N, 7,4 µl, 0,75 eq.).

#### 15 Ejemplo 11: Estudios de farmacocinética y farmacodinámica en ratones que portan tumor

##### Ratones desnudos que portan tumores H2122

Se utilizaron ratones desnudos que portan xenoinjertos de tumor H2122 (línea de células de cáncer de pulmón de

células no pequeñas humano) para los estudios de farmacocinética. El Compuesto 1 se formuló en agua con decanoato de sodio y PEG400 (5 mg/ml) y se administró oralmente (PO) a través de sonda gástrica a cada animal a una dosis de 50 mg/kg. A varios puntos de tiempo después de la administración del compuesto, se sometieron a eutanasia tres ratones por punto de tiempo con CO<sub>2</sub>, y se recogieron sangre y tejidos de tumor. La sangre se recogió en tubos que contenían heparina de sodio. El plasma se separó por centrifugación. El plasma y los tejidos se almacenaron a -80°C para análisis posterior. Un sistema de LC-MS/MS PE Sciex API-3000 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) se utilizó para analizar las concentraciones de compuesto en plasma y tejidos de tumor.

Los resultados de este estudio se resumen en la Figura 1 y la Tabla 2, siguiente. La Figura 1 es un gráfico de la concentración del Compuesto 1 en plasma y tejido de tumor frente al tiempo después de administración oral. Los resultados muestran que el Compuesto 1 se acumula de preferencia en tejido de tumor. Esto se ve apoyado por los resultados mostrados en la Tabla 3, que muestran una vida media significativamente más larga del Compuesto 1 en tejido de tumor que en plasma así como una exposición significativamente mayor de tejido de tumor al Compuesto 1 (AUC).

Tabla 2

Parámetro	Plasma	Tumor
Vida media (Horas)	5,9	10,1
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	186	154
Área bajo la Curva (ng/mL*hr)	478	2.126
Biodisponibilidad (%)	7,8	14,8

#### Ratones SCID que portan tumores Daudi

Se implantaron células Daudi (línea de células de linfoma no de Hodgkin) en ratones Scid hembra (inmunodeficientes combinados severos). Después del establecimiento de los tumores, los animales se dosificaron por sonda gástrica oral con 25, 50 ó 100 mg/kg del Compuesto 1, formulado en Captisol al 30%, pH 10, a una concentración de 1,875, 3,75 ó 7,5 mg/mL, respectivamente.

A varios puntos de tiempo después de la administración del compuesto, se sometieron a eutanasia tres ratones por punto de tiempo con CO<sub>2</sub>, y se recogieron sangre y tejidos de tumor. La sangre se recogió en tubos que contenían heparina de sodio. El plasma se separó por centrifugación. El plasma y los tejidos se almacenaron a -80°C para análisis posterior. Un sistema de LC-MS/MS PE Sciex API-3000 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) se utilizó para analizar las concentraciones de compuesto en plasma.

Los resultados de este estudio se resumen en las Figuras 2A, 2B y 2C y en la Tabla 3, siguiente. La Figura 2A es un gráfico de la concentración del Compuesto 1 en plasma frente al tiempo después de administración oral y muestra una exposición dependiente de la dosis al compuesto. La Figura 2B es un gráfico de la concentración del Compuesto 1 en tejido de tumor frente al tiempo después de administración oral. Los resultados muestran que el Compuesto 1 se acumula de preferencia en tejido de tumor de manera dependiente de la dosis. Las concentraciones en plasma y tumor después de la dosis de 100 mg/kg se comparan en la Figura 2C, que muestra que el tejido de tumor capta de preferencia el Compuesto 1. Esto se ve apoyado por los resultados mostrados en la Tabla 3, que muestran una vida media significativamente más larga del Compuesto 1 en tejido de tumor que en plasma así como una exposición significativamente mayor de tejido de tumor al Compuesto 1 (AUC).



Tabla 3

Parámetro	Plasma	Tumor
Vida media (Horas)	7,73	12,62
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	2.285,39	1.044,7
Área bajo la Curva (ng/mL*hr)	1.899,26	3.973,56
T <sub>máx</sub> (hr)	0,24	0,10

## Farmacodinámica

- 5 Los tumores se recogieron para evaluación de PD después de tratamiento con una única dosis de Compuesto 1 a 25 mg/Kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg. La proteína se extrajo de los tejidos de tumor utilizando un Tissuelyser (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizaron rutinariamente 30 µg de proteína para análisis WB como se ha descrito anteriormente. Los lisados celulares se resolvieron en geles Bis-Tris 4-12% NuPAGE Novex (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Las transferencias se ensayaron con varios anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Se utilizó GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 1:30.000, Abcam, Cambridge, MA) como un control interno para cada ensayo. Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios marcados con infrarrojos (1:10.000) conjugados con IR Dye-800 (Rockland Immunochemicals, Inc., Gilbertsville, PA) o conjugados con Alexa 680 (Invitrogen). Se formaron imágenes de las membranas con el Sistema de Formación de Imágenes de Infrarrojo Odyssey (Li-Cor Biotechnology, Lincoln, NE).
- 10
- 15 Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 3, que presenta transferencias Western de extractos de tejido de tumor de los tres grupos de dosis. Estos resultados muestran que el Compuesto 1 inhibe la ruta PI3K-AKT-mTOR, suprime las rutas RAF-MEK-ERK, regula a la baja los niveles de proteína RTK y regula al alza los niveles de los supresores de tumor p53 y p21.

**Ejemplo 12: Estudio de farmacocinética en perros**

- 20 También se realizó un estudio de farmacocinética del Compuesto 1 en perros beagle utilizando administración iv a 5 mg/kg en agua con decanoato de sodio/PEG400 (5 mg/ml) y administración oral a 5 mg/kg con decanoato de sodio/PEG4000/PEG1450 (pH 10) en cápsulas entéricas. El plasma se recogió a varios puntos de tiempo y se analizó para concentración del Compuesto 1 por LC-MS/MS. Los resultados del estudio se muestran en la Figura 4 y Tabla 4, siguiente. La Figura 4 es un gráfico de la concentración en plasma frente al tiempo tanto para la dosificación oral como iv. Se consiguen niveles significativos en plasma del Compuesto 1 mediante dosificación oral.
- 25

Tabla 4

Parámetro	IV	Cápsula PO
Vida media (Horas)	1,85	4,88
C <sub>máx</sub> (ng/mL)	6.156,16	312,1
Área bajo la Curva (ng/mL*hr)	2.977,47	450,4
Biodisponibilidad (%)		15,1

**Ejemplo 13: Estudio de farmacocinética en ratas**

- 30 El propósito de este estudio fue determinar la farmacocinética en plasma del Compuesto 1 en ratas Sprague-Dawley macho después de administración oral del Compuesto 1.

El Compuesto 1 se disolvió en Captisol al 30% en agua para rendir una concentración nominal de 10 mg/mL (pH = 10) para administración oral. La disolución amarilla clara resultante se almacenó a temperatura ambiente hasta que se tomó para dosificación.

- 35 Se utilizaron tres ratas Sprague-Dawley macho de Charles River Laboratories en este estudio. Se proporcionó dieta rica en grasa (VHFD, D12492i) de Research Diets Inc. *ad libitum* a lo largo de la parte in vivo del estudio. El Compuesto 1 se administró mediante una única dosis con sonda gástrica oral (PO) a 20 mg/kg.

Se recogieron muestras de sangre (volumen aproximado 150 µl) de la vena de la cola a 0,25, 0,5, 1, 3, 6, y 24 horas

después de la dosis. Las muestras de sangre se pusieron en tubos que contenían heparina de sodio y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 6 minutos a 4°C para separar el plasma de las muestras. Después de la centrifugación, el plasma resultante se transfirió a tubos limpios y se almacenó congelado a -80°C pendiente de bioanálisis.

- 5 Las concentraciones del Compuesto 1 y su metabolito primario en las muestras de plasma se determinaron usando un sistema de LC-MS/MS PE Sciex API-3000 (PE-Sciex., Foster City, CA).

Los parámetros farmacocinéticos se determinaron a partir de los datos medios concentración-tiempo en los sujetos de ensayo. Se utilizó un modelado compartimental de WINNONLIN® Professional 5.2. para calcular los parámetros. Cualquier concentración que estaba por debajo del límite de cuantificación (límite inferior de cuantificación = 1 mg/mL) se omitió del cálculo de los parámetros en animales individuales.

Después de la administración oral del Compuesto 1, los valores medios de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $T_{m\acute{a}x}$  para el Compuesto 1 fueron 39,5 µg/L y 0,1 hr, respectivamente. El valor medio de  $AUC_{(0-\infty)}$  fue 163,6 µg/L\*hr. El valor de la vida media ( $T_{1/2}$ ) fue 11,7 hr.

#### Ejemplo 14: Evaluación del Compuesto 1 en modelos de xenoinjertos de tumor

- 15 A. Modelos de xenoinjertos de tumor SU-DHL4, H2122, Daudi y OPM2

Se implantaron células SU-DHL4 (línea de células de linfoma de células B grandes difuso), H2122 (línea de células NSCLC humana), Daudi (línea de células de linfoma no Hodgkin), y OPM2 (línea de células de tumor de mieloma múltiple) bien en ratones desnudos o Scid (inmunodeficientes combinados severos). Después del establecimiento de los tumores, los animales con un tamaño tumoral suficiente se asignaron aleatoriamente en grupos activo (Compuesto 1) y control (vehículo). El Compuesto 1 se formuló para administración oral como en el Ejemplo 7(b), y se administró por sonda gástrica oral sobre la base del peso corporal de cada animal individual. Los grupos control se trataron con vehículo utilizando el mismo esquema de dosificación que el grupo activo correspondiente.

El grupo de tumor H2122 (ratones desnudos) recibió el Compuesto 1 a dosis de 75 mg/kg dos veces al día inicialmente y después 50 mg/Kg dos veces al día desde el Día 11 cinco días a la semana debido a la pérdida de peso corporal a 75 mg/kg. En un estudio, el grupo de tumor Daudi (ratones Scid) recibió el Compuesto 1 a dosis de 25, 50 ó 100 mg/Kg cinco días a la semana. En otro estudio, el grupo de tumor Daudi se dosificó a 50 mg/Kg dos veces al día cinco días a la semana. En otro estudio, se comparó la eficacia del Compuesto 1 administrado oralmente en el modelo de tumor Daudi con GDC-0941 oral y vorinostat oral, ambos individualmente y en combinación. El grupo de tumor OPM2 recibió el Compuesto 1 a dosis de 50 mg/kg dos veces al día cinco días a la semana. El grupo de tumor SU-DHL4 se dosificó a 100 mg/Kg oralmente ó 50 mg/Kg intravenosamente.

Los tumores se midieron durante el periodo de estudio con un calibrador electrónico, y los pesos corporales se midieron dos veces a la semana. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

El porcentaje de cambio del volumen tumoral se utilizó para describir la actividad del compuesto durante el periodo de tratamiento.

Los resultados de estos estudios se resumen en las Figuras 5A a 5C y 9 a 12, que muestran el tamaño tumoral frente al tiempo para los grupos activo y control para cada uno de los tipos de tumor. Las Figuras 5A, 5B, 5C y 12 muestran que el Compuesto 1 es eficaz en los modelos de tumor H2122, Daudi y OPM2. Como se muestra en la Figura 9, el Compuesto 1 inhibió el crecimiento del tumor Daudi de una manera dependiente de la dosis. La Figura 10 compara la actividad antitumoral del Compuesto 1 a 100 mg/Kg en el modelo Daudi bien con GDC-0941 o vorinostat solo o en combinación. Las dosis indicadas son la dosis máxima tolerada (MTD) de cada tratamiento, y el tamaño tumoral pretratamiento fue  $157 \pm 65 \text{ mm}^3$  (media  $\pm$  SE). Los datos indican que el Compuesto 1 es más eficaz que vorinostat, GDC-0941, o una combinación de ambos. Finalmente, el Compuesto 1 inhibió fuertemente el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de linfoma de células B grandes difuso SU-DHL4 después de administración intravenosa (IV) a 50 mg/kg u oralmente (PO) a 100 mg/kg (Figura 11). El tamaño tumoral pretratamiento fue  $147 \pm 21 \text{ mm}^3$ .

#### Modelo de xenoinjerto MM1S

Se estabularon ratones hembra SCID/Beige de 4 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas (INNOCAGE@IVC, Innovive Inc., San Diego, CA) en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID/Beige se esterilizaron autoclavando antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

Las células de MM humanas MM1S (Goldman-Leikin RE, et al., *J Lab Clin Invest.* 1980; 113: 335-345) se obtuvieron originalmente de sangre periférica de un paciente con mieloma múltiple. Las células criopreservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se cultivaron en medio RPMI más suero fetal bovino (FBS) al 10% en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de contaminantes y patógenos de roedores con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón). Cuando las células en cultivo fueron suficientes para implante, se lavaron con disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en HBSS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección y se inyectaron 20 millones de células por animal suspendidas en 0,2 ml de HBSS subcutáneamente en la región del flanco trasero derecho del ratón después de un mínimo de 7 días de periodo de aclimatación, usando una jeringa de 1CC con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

Tres semanas después del implante del tumor, los tumores alcanzaron una media de 194,6 ± 37,9 mm<sup>3</sup>. Los animales con un tamaño y forma tumoral aceptable se asignaron aleatoriamente a dos grupos de ocho animales cada uno, utilizando software de separación, un grupo de control de vehículo y uno de tratamiento.

El Compuesto 1 se formuló y se dosificó como sigue: se disolvieron 7,5 mg/ml en Captisol al 30% con 2 equivalentes molares de NaOH y HCl cada uno y se dosificaron por sonda gástrica oral cada día cinco veces a la semana sobre la base del peso corporal de cada ratón. El grupo control se dosificó con vehículo (Captisol al 30%) utilizando el mismo paradigma de dosificación.

Durante cada estudio animal, los tumores se midieron con calibradores, el tamaño tumoral se determinó utilizando la fórmula mencionada anteriormente, y se calcularon los cambios en el tamaño tumoral en porcentaje. Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza dos veces a la semana. Los estudios se continuaron hasta: a) la fecha de fin predeterminada indicada en el diseño del estudio; o b) el inicio de problemas de salud, lo que ocurriera antes. Además, los siguientes parámetros relacionados con tumor justificaron la aplicación de eutanasia: (1) carga tumoral que excede 2.500 mm<sup>3</sup> y/o (2) pérdida de ≥20% del peso corporal de partida. Además de la determinación de los cambios en el tamaño tumoral, la última medida de tumor se utilizó para generar la proporción del cambio en el peso tumoral (valor T/C), una medida estándar desarrollada por el National Cancer Institute (NCI) para la evaluación de xenoinjertos de tumor. Los valores T/C se calcularon utilizando la fórmula siguiente: %T/C = 100 x ΔT/ΔC si ΔT>0. En los casos en los que ocurrió la regresión tumoral, sin embargo, se utilizó la fórmula siguiente: %T/T<sub>0</sub> = 100 x ΔT/T<sub>0</sub> si ΔT<0.

El periodo de tratamiento fue 15 días. Los tamaños tumorales y pesos corporales se midieron de nuevo en el último día del estudio.

Como se muestra en la Figura 13, el Compuesto 1 como agente único inhibió el crecimiento tumoral en el modelo de tumor subcutáneo MM1S. Se calcula que los valores T/C son 27,37% (p<0,0001, ANOVA) sobre la base del día 14. No se observó pérdida de peso corporal u otros efectos secundarios para el grupo de tratamiento con el Compuesto 1 como agente único.

#### Modelo de xenoinjerto MM1R

Se estabularon ratones hembra SCID/Beige de 4 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas (INNOCAGE@IVC, Innovive Inc., San Diego, CA) en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID/Beige se esterilizaron autoclavando antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

Las células de MM humanas MM1R se obtuvieron originalmente de sangre periférica de un paciente con mieloma múltiple (Goldman-Leikin RE, et al., *J Lab Clin Invest.* 1980; 113: 335-345). Las células criopreservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se cultivaron en medio RPMI más suero fetal bovino (FBS) al 10% en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de contaminantes y patógenos de roedores con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón). Cuando las células en cultivo fueron suficientes para implante, se lavaron con disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en HBSS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección y se inyectaron 15 millones de células por animal suspendidas en 0,1 ml de HBSS subcutáneamente en la región del flanco trasero derecho del ratón después de un mínimo de 7 días

de periodo de aclimatación, usando una jeringa de 1CC con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

5 Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

Tres semanas después del implante del tumor, los tumores alcanzaron una media de  $131,7 \pm 28,7 \text{ mm}^3$ . Los animales con un tamaño y forma tumoral aceptable se asignaron aleatoriamente a dos grupos de ocho animales cada uno, utilizando software de separación, un grupo de control de vehículo y uno de tratamiento.

10 El Compuesto 1 se formuló y se dosificó como sigue: se disolvieron 7,5 mg/ml en Captisol al 30% con 2 equivalentes molares de NaOH y HCl cada uno y se dosificaron por sonda gástrica oral cada día cinco veces a la semana sobre la base del peso corporal de cada ratón. El grupo control se dosificó con vehículo (Captisol al 30%) utilizando el mismo paradigma de dosificación.

15 Durante cada estudio animal, los tumores se midieron con calibradores, el tamaño tumoral se determinó utilizando la fórmula mencionada anteriormente, y se calcularon los cambios en el tamaño tumoral en porcentaje. Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza dos veces a la semana. Los estudios se continuaron hasta: a) la fecha de fin predeterminada indicada en el diseño del estudio; o b) el inicio de problemas de salud, lo que ocurriera antes. Además, los siguientes parámetros relacionados con tumor justificaron la aplicación de eutanasia: (1) carga tumoral que excede  $2.500 \text{ mm}^3$  y/o (2) pérdida de  $\geq 20\%$  del peso corporal de partida. Además de la  
20 determinación de los cambios en el tamaño tumoral, la última medida de tumor se utilizó para generar la proporción del cambio en el peso tumoral (valor T/C), una medida estándar desarrollada por el National Cancer Institute (NCI) para la evaluación de xenoinjertos de tumor. Los valores T/C se calcularon utilizando la fórmula siguiente:  $\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$  si  $\Delta T > 0$ . En los casos en los que ocurrió la regresión tumoral, sin embargo, se utilizó la fórmula siguiente:  $\%T/T_0 = 100 \times \Delta T/T_0$  si  $\Delta T < 0$ .

25 El periodo de tratamiento fue 18 días. Los tamaños tumorales y pesos corporales se midieron de nuevo en el último día del estudio.

Como se muestra en la Figura 14, el Compuesto 1 como agente único inhibió el crecimiento tumoral en el modelo de tumor subcutáneo MM1R. Se calcula que los valores T/C son 21,15% ( $p < 0,0001$ , ANOVA) sobre la base del día 17. No se observó pérdida de peso corporal u otros efectos secundarios para el grupo de tratamiento con el Compuesto  
30 1 como agente único.

#### **Ejemplo 15: Efecto del Compuesto 1 en linfocitos circulantes**

Se llevó a cabo un estudio que examinó el efecto del Compuesto 1 en linfocitos T y B circulantes en ratones de tipo salvaje CD1. Se trataron cinco ratones con el Compuesto 1 formulado como en el Ejemplo 8(b) (5 mg/mL) a 100 mg/kg oralmente durante cinco días consecutivos. Otros 5 ratones se trataron con vehículo. Se recogió sangre a  
35 varios puntos de tiempo (incluyendo pre-dosificación, durante la dosificación y post-dosificación) de la vena mandibular. La sangre se analizó con un citómetro de flujo para la cuantificación de células T y B.

También se evaluó el efecto del Compuesto 1 en los niveles de linfocitos T y B en órganos linfoides, bazo y nodos linfáticos. Los ratones se trataron con el Compuesto 1 oralmente a 100 mg/kg durante cinco días consecutivos. Los animales se sacrificaron, y se recogieron los órganos linfoides. Las células se disociaron físicamente de los tejidos y  
40 se analizaron con un citómetro de flujo. Se utilizaron anticuerpos anti-CD3 y anti-CD19 para teñir las células T y B, respectivamente.

Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 6, un gráfico que muestra los niveles de linfocitos en sangre durante el tiempo. El Compuesto 1 muestra una reducción reversible significativa en los niveles en sangre tanto de linfocitos T como B comparado con el control. Se observa un efecto similar en los niveles de linfocitos en el  
45 bazo y nodos linfáticos. Estos dos órganos muestran una reducción significativa tanto en linfocitos T como B después de dosificación con el Compuesto 1 comparado con los controles.

#### **Ejemplo 16: Efecto del Compuesto 1 en células hematopoyéticas en la médula ósea**

La médula ósea también se extirpó de los ratones sacrificados en el Ejemplo 12. El contenido de la médula ósea se recogió de los huesos largos de los ratones y se analizó con citómetro de flujo. Se utilizaron varios marcadores para  
50 linfocitos progenitores o maduros. Los resultados mostraron que el tratamiento con el Compuesto 1, mientras causaba una disminución en los recuentos de linfocitos T y B periféricos, inducía un incremento compensatorio en las células progenitoras de linfocitos en la médula comparado con los controles.

#### **Ejemplo 17: Mini ensayo de mutación inversa *Salmonella*/microsomas de mamíferos**

Este estudio se llevó a cabo para evaluar la capacidad del Compuesto 1 para inducir mutaciones inversas en

presencia o ausencia de enzima microsomal de mamífero (mezcla S9) en el locus de histidina en el genoma de 2 cepas de *Salmonella typhimurium* (TA98 y TA100).

5 Las cepas de ensayo utilizadas en el ensayo de mutagenicidad fueron las cepas de ensayo de *Salmonella typhimurium* TA98 (para detectar mutación inversa de desplazamiento de marco) y TA100 (para detectar mutación inversa puntual). El ensayo se llevó a cabo tanto en presencia como ausencia de mezcla S9 junto con controles concurrentes de vehículo (DMSO, 20 µl/pocillo) y positivos en duplicado usando placas de 6 pocillos. Se ensayaron cinco concentraciones con diluciones sucesivas 2X que variaron de 1.000 a 62,5 µg/pocillo (equivalente a 5.000 a 312,5 µg/placa en el ensayo de Ames estándar) para cada uno de los compuestos. Después de incubar a 37<sup>0</sup>C  
10 para contar colonias revertantes. Un incremento de dos veces reproducible (>2x del control de vehículo) de colonias revertantes sobre el valor de control medio diario se considera una respuesta positiva de mutación génica para cada cepa.

15 El Compuesto 1 se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO), que también sirvió como el control negativo (vehículo). 2-nitrofluoreno y azida de sodio sirvieron como los controles positivos en ausencia de S9 para TA98 y TA100 respectivamente. 2-Aminoantraceno sirvió como los controles positivos en presencia de S9 para TA98 y TA100.

#### Resultados

20 El Compuesto 1 formó una disolución granate cuando se disolvió en DMSO a una concentración de 50 mg/ml, que fue la disolución madre más concentrada. El artículo de ensayo permaneció como una disolución granate claro a incolora en todas las diluciones sucesivas 2X bajando hasta 3,125 mg/ml. La precipitación del artículo de ensayo se observó cuando el artículo de ensayo y el agar blando se mezclaron conjuntamente a la concentración de 250 µg/pocillo y por encima. Después de 48-72 horas de incubación, la precipitación del artículo de ensayo se observó ligeramente en microscopía de disección a 250 µg/pocillo con TA98 y TA100 en ausencia de mezcla S9 sólo, la precipitación del artículo de ensayo y una reducción menor del césped de fondo se observaron ligeramente a moderadamente a 500 y 1.000 µg/pocillo con TA98 y TA100 en presencia y ausencia de mezcla S9. No hubo  
25 evidencia de un incremento significativo en el número medio de colonias revertantes comparado con el control promedio cuando se ensayó en presencia y ausencia de mezcla S9 con las cepas TA98 y TA100 (Tabla 5).

30 Los resultados del presente estudio mostraron que el Compuesto 1 no indujo una respuesta mutagénica positiva con las cepas TA98 y TA100 en presencia y ausencia de enzimas microsomales cuando los artículos de ensayo se ensayaron hasta la concentración máxima de 1.000 µg/pocillo (equivalente a 5.000 µg/placa en el ensayo de Ames estándar).

Tabla 5: Resultados del ensayo de mutagenicidad del Compuesto 1

		REVERTANTES POR POCILLO						
Conc. µg/pocillo		TA98			TA100			Césped de fondo <sup>C</sup>
		1	2	Media	1	2	Media	TA98/TA100
MICROSOMAS: NO (-S9)								
DMSO	-	5	6	<b>6</b>	26	32	<b>29</b>	4/4
Compuesto 1	62,5	4	4	<b>4</b>	34	30	<b>32</b>	4/4
Compuesto 1	125	4	6	<b>5</b>	32	34	<b>33</b>	4/4
Compuesto 1	250	6	5	<b>6</b>	34	29	<b>32</b>	4,sp/4,sp
Compuesto 1	500	5	3	<b>4</b>	33	31	<b>32</b>	3,sp/3,sp
Compuesto 1	1.000	4	5	<b>5</b>	28	26	<b>27</b>	3,mp/3,mp
CONTROL POSITIVO <sup>a</sup>		55	63	<b>59*</b>	>300	>300	<b>&gt;300*</b>	4/4
MICROSOMAS (+s9)								
DMSO	-	6	6	<b>6</b>	34	33	<b>34</b>	4/4
Compuesto 1	62,5	4	6	<b>5</b>	34	30	<b>32</b>	4/4
Compuesto 1	125	6	3	<b>5</b>	28	30	<b>29</b>	4/4
Compuesto 1	250	8	6	<b>7</b>	30	28	<b>29</b>	4/4
Compuesto 1	500	6	6	<b>6</b>	32	37	<b>35</b>	3,sp/3,sp
Compuesto 1	1.000	6	7	<b>7</b>	33	34	<b>34</b>	3,mp/3,mp
CONTROL POSITIVO <sup>b</sup>		>300	>300	<b>&gt;300*</b>	>300	>300	<b>&gt;300*</b>	4/4

<sup>a</sup>TA98: 2-nitrofluoreno, 0,4 µg/pocillo; TA100: Azida de sodio, 2,0 µg/pocillo

<sup>b</sup>TA98 y TA100: 2-aminoantraceno, 0,8 µg/pocillo

<sup>c</sup>Códigos de evaluación del césped de fondo:

5. crecimiento aumentado comparado con los controles de disolvente,
4. similar al control de vehículo (normal, sin toxicidad),
3. menos de 25% de reducción (menos de 25% de citotoxicidad),
2. más de 25% pero menos de 50% de reducción (menos de 50% de citotoxicidad),
1. más de 50% de reducción (más de 50% de citotoxicidad),
0. no crecimiento (100% de citotoxicidad).

sp = precipitado ligero mp = precipitado moderado hp = precipitado fuerte

\*: incremento positivo

**Ejemplo 18: Estudio farmacodinámico en líneas de células de tumor**

Las líneas de células de tumor H460 (Kras, PI3K), BT474 (HER2, PI3K), A375 (B-Raf) y H1975 (EGFR, PI3K) se cultivaron y se trataron con DMSO solo (control de vehículo) ó 0,1  $\mu$ moles/L de Compuesto 1 o compuesto de referencia durante 16 horas. Se prepararon extractos celulares en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol y se resolvieron en geles de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a filtro de nitrocelulosa y el ensayo se hizo usando procedimientos estándar con disoluciones de bloqueo (Li-Cor Bioscience) que contenían el anticuerpo primario indicado. Los anticuerpos primarios frente a p-EGFR, EGFR, p-HER2, HER2, p-HER3, HER3, p-MET, MET, p-bRaf, p-cRaf, pMEK, MEK, p-ERK, ERK y tubulina se adquirieron en Cell Signaling Technology. Se utilizó anticuerpo secundario conjugado con IRdye 680, 800 CW y la señal se detectó con el formador de imágenes Li-Cor Odyssey.

Se realizó inmunocitoquímica en las células crecidas en cultivo en monocapa que se trataron como se indica en las leyendas de las figuras y después se fijaron en paraformaldehído al 4% (p/v). Después de lavar en 1xPBS, se realizó la inmunotinción en disolución de bloqueo Li-Cor que contenía los anticuerpos primarios indicados y anticuerpos secundarios conjugados con IRDye 680 ó 800CW. Para el western en células, se utilizó un formador de imágenes de infrarrojo Li-Cor Odyssey para la detección y cuantificación de los resultados.

Para el examen histológico de los marcadores farmacodinámicos, se recogieron xenoinjertos de tumor y se incluyeron en parafina, y se prepararon secciones de 4-5 mm. Las secciones se montaron en portaobjetos y se hicieron reaccionar con anticuerpos primarios seguido de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Envision polímero-HRP, Dako, Glostrup, Dinamarca). La reacción de color se realizó utilizando diaminobencidina (DAB) según recomienda el proveedor. La contratinción de las secciones se hizo con hematoxilina.

Los resultados de este estudio se resumen en las Figuras 7A-7g y 8A-8C. El Compuesto 1 inhibe la actividad de HDAC y la señalización de la ruta PI3K en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) H460 mutantes KRAS y PI3KCA. Las células se trataron con DMSO solo (control de vehículo) o que contenía los compuestos de ensayo durante 1 h antes de realizar la transferencia Western o western en células. La Figura 7A muestra que el Compuesto 1 a 1  $\mu$ mol/L incrementa los niveles de histona 3 acetilada (Ac-H3), tubulina (Ac-Tub), y p53 (Ac-p53). El compuesto también regula al alza el contenido total de p53 y p21. Los datos mostrados en las Figuras 7B-7E muestran que el Compuesto 1 incrementa los niveles de tubulina acetilada (Figura 7B), histona 3 acetilada (Figura 7C), p53 acetilado (Figura 7D), y p21 acetilado (Figura 7E) de una manera dependiente de la dosis. Los valores  $CI_{50}$  resultantes sugieren que el Compuesto 1 tiene una potencia inhibidora de HDAC comparable a LBH 589 en las células de cáncer examinadas. A 1  $\mu$ mol/L, el Compuesto 1 inhibe la activación de AKT y las proteínas de señalización aguas abajo 4EBP-1 y p70S6 (Figura 7F). El Compuesto 1 también inhibe de manera persistente y potente la fosforilación de Akt de una manera dependiente de la dosis (Figura 7G).

Una limitación importante de los inhibidores de PI3K en el tratamiento de los cánceres es la activación de la ruta RAF-MEK-ERK. Los inhibidores de HDAC son capaces de inhibir los niveles de quinasa en esta ruta de señalización en células de cáncer a través de modificación epigenética. En las células de tumor con varias mutaciones, tales como las mutaciones KRAS y PI3K en células H460, la mutación B-Raf en las células A375, las mutaciones HER2 y PI3K en las células BT-474, y las mutaciones EGFR en las células H1975, 100 nM de Compuesto 1 suprimió la activación de Raf, MEK, y ERK. El potente inhibidor de HDAC LBH 589 mostró actividades similares en algunos de estos ensayos de transferencia Western (Figura 8A).

Además de la inhibición de las rutas PI3K y MEK, el tratamiento de células de mieloma RPMI-8226 con 1  $\mu$ M de Compuesto 1 durante 16 h inhibió p-STAT3 (Y-705) y p-Src (Figura 8B).

En células NSCLC H1975 dobles mutantes EGFR-L858R-T790M y células de cáncer de mama BT-474 que sobreexpresan HER2, se mostró que el Compuesto 1 reducía los niveles de tirosina quinasas de receptor fosforiladas y totales EGFR, HER2, HER3, y MET después de incubación durante 16 h. Se observó una regulación a la baja similar de las mismas quinasas después de tratamiento de estas células con LBH 589 (Figura 8C).

**Ejemplo 19: Expresión de PI3K110  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$  en modelos de xenoinjertos de tumor hematológico**

Se estabularon ratones hembra inmunodeficientes (Beige/SCID) de 6-8 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID beige eran desechables, y se adquirieron irradiados de Innovive antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

Las líneas de células de cáncer hematológico humano se obtuvieron originalmente de pacientes humanos con cáncer. Las células crioconservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se cultivaron en medio RPMI más suero fetal bovino (FBS) al 10-15% en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de contaminantes y patógenos de roedores con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón).

5 Cuando las células en cultivo alcanzaron el número deseado, se recogieron y se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en DPBS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección. Después de un periodo de aclimatación de siete días, se inyectaron 10 a 20 millones de células por animal suspendidas en 0,1 ml de DPBS subcutáneamente (SC) en la región del flanco trasero derecho del animal usando una jeringa de 0,5CC con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

10 Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas y media después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

15 Cuando los tamaños tumorales alcanzaron aproximadamente 150-300 mm<sup>3</sup>, los ratones se separaron en cuatro grupos incluyendo tres grupos de tratamiento (25 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg) y un grupo control. Después de la dosificación con el Compuesto 1, los tumores se recogieron a los 15 minutos, 1, 3, 6, 24 horas (3 ratones para cada punto de tiempo). Los tumores se recogieron de acuerdo con los puntos de tiempo listados anteriormente después de someter a los ratones a eutanasia con CO<sub>2</sub>. Las muestras se pusieron en nieve carbónica hasta que se transfirieron a un congelador a -80°C para análisis por transferencia Western.

20 La proteína se extrajo de los tejidos de tumor utilizando un homogeneizador (Tissuelyser, Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los adaptadores para mantener los tubos de tejido se congelaron a -20°C, y el tampón de lisis y los lechos se enfriaron a 4°C antes del uso.

25 Se homogeneizaron 100-200 µg de tejido en 300 µl de reactivo de Extracción de Proteína de Tejido de Mamífero T-PER (Pierce, Rockford, IL) suplementado con inhibidores de fosfatasa (1:100 v/v, mezclas de inhibidores de fosfatasa Tyr y Ser/Thr, Upstate). La muestra se evaluó visualmente después de cada ciclo (tiempo: 0,15 minutos; frecuencia: 30 Hz) hasta que los tejidos estaban completamente homogeneizados. Se necesitaron aproximadamente cuatro ciclos en la mayor parte de los casos. Los lisados de tejido se centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se recogieron 200 µl de sobrenadante y se guardó a -80°C. La concentración de proteína se midió utilizando el kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

30 Se resolvieron 30 µg de extracto de proteína total en geles Bis-Tris 4-12% NuPAE Novex (Invitrogen) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) utilizando una Máquina de Transferencia Semi-Dry de Bio-Rad. Las transferencias se incubaron con 10 ml de Tampón de Bloqueo (Sistema de Formación de Imágenes de Infrarrojo Odyssey) durante 1 hora y se ensayaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en un agitador. Las transferencias se ensayaron con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios incluyeron PI3 Quinasa p110α (#4249, 1:1.000, Cell Signaling), PI3 Quinasa p110β (#3011, 1:1.000, Cell Signaling), PI3 Quinasa p110γ (#5405, 1:1.000, Cell Signaling), PI3 Quinasa p110δ (SC-7176 (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, 1/30.000, Abcam, Cambridge, MA) se utilizó como un control interno para cada ensayo.

40 La membrana se lavó cuatro veces con disolución salina tamponada con Tris Tween-20 (TBST; DAKO) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con infrarrojo (1: 10.000): anti-Conejo conjugado con IR Dye 800 (Rockland), o anti-Ratón conjugado con Alexa 680 (Molecular Probes). La membrana se lavó con TBST y se puso en el Sistema de Formación de Imágenes de Infrarrojo Odyssey para la formación de imágenes y análisis.

Los resultados se muestran en la Figura 15, que muestra transferencias Western de isoformas de PI3K p110, AKT y pAKT de varios xenoinjertos de linfoma no de Hodgkin y mieloma múltiple. Los resultados muestran que la activación de AKT está dirigida por múltiples isoformas de PI3K P110.

#### 45 **Ejemplo 20: Comparación de Compuesto 1 y CAL-101 en el modelo de xenoinjertos de tumor Daudi**

50 Se estabularon ratones hembra SCID (CD-1 Beige SCID) de 6-8 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID beige eran desechables, y se adquirieron irradiados de Innovive antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

55 Las células de linfoma de Burkitt humano Daudi se obtuvieron originalmente de un paciente humano con linfoma de Burkitt. Las células criopreservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se cultivaron en medio RPMI-1640 más suero fetal bovino (FBS) al 15%, 1% Penstrep, y 1% Glutamax en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de patógenos con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón). Cuando



las células en cultivo alcanzaron el número deseado, se recogieron por centrifugación. Después de la recogida, las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en DPBS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección y se inyectaron 20 millones de células por animal suspendidas en 0,1 ml de DPBS subcutáneamente en la región del flanco trasero derecho del ratón después de un

5 mínimo de 7 días de periodo de aclimatación, usando una jeringa de 0,5CC con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

10 Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

Cuatro semanas después del implante del tumor, los tumores alcanzaron un tamaño medio de  $300 \pm 126 \text{ mm}^3$ . Los animales con un tamaño y forma tumorales aceptables se asignaron aleatoriamente a tres grupos de siete animales cada uno, utilizando software de separación, un grupo control de vehículo y dos de tratamiento.

15

Grupos	Número de ratones	Compuestos	Dosis (mg/kg)	Esquema
1	7	Captisol al 30%	0	Qd* (lunes-viernes), PO**
2	7	CAL-101	30	BID*** (lunes-viernes)
3	7	Compuesto 1	100	Qd* (lunes-viernes), PO**

\*QD = Dosificación una vez al día, \*\*PO = Dosificación por sonda gástrica oral, \*\*\*BID, dos veces al día

El Compuesto 1 se formuló y se dosificó como sigue: el Compuesto 1 (7,5 mg/ml) se disolvió en Captisol al 30% con 2 equivalentes molares de NaOH, equilibrado con 2 equivalentes molares de HCl, y se dosificó mediante sonda gástrica oral diariamente de lunes a viernes. El grupo control se dosificó con vehículo (Captisol al 30%) utilizando el mismo paradigma de dosificación que el volumen 100 mg/kg (6,67 µl/g).

20

Durante cada estudio con animales, los tumores se midieron con calibradores, el tamaño tumoral se determinó utilizando la fórmula mencionada anteriormente, y se calcularon los cambios en el tamaño tumoral en porcentaje. Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza dos veces a la semana. Los estudios se continuaron hasta: a) la fecha de fin predeterminada indicada en el diseño del estudio; o b) el inicio de problemas de salud, lo que ocurriera antes. Además, los siguientes parámetros relacionados con tumor justificaron la aplicación de eutanasia: carga tumoral que excede  $2.500 \text{ mm}^3$  y/o pérdida de  $\geq 20\%$  del peso corporal de partida. Además de la determinación de los cambios en el tamaño tumoral, la última medida de tumor se utilizó para generar la proporción del cambio en el peso tumoral (valor T/C), una medida estándar desarrollada por el National Cancer Institute (NCI) para la evaluación de xenoinjertos de tumor. Los valores T/C se calcularon utilizando la fórmula siguiente:  $\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$  si  $\Delta T > 0$ . En los casos en los que ocurrió la regresión tumoral, sin embargo, se utilizó la fórmula siguiente:  $\%T/T_0 = 100 \times \Delta T/T_0$  si  $\Delta T < 0$ .

25

30

El periodo de tratamiento fue 15 días para los grupos de vehículo y CAL-101, que requirieron una finalización temprana debido a que el tamaño tumoral excedió el 10% del peso corporal, y 18 días para el grupo del Compuesto 1. Los tamaños tumorales y pesos corporales se midieron de nuevo en el último día del estudio.

35

Los resultados del estudio se presentan en la Figura 16, que muestra el crecimiento tumoral para los grupos activo y control como una función del tiempo de tratamiento. El grupo del Compuesto 1 mostró un crecimiento tumoral significativamente reducido comparado con los grupos CAL-101 y control.

#### Ejemplo 21: Combinación del Compuesto 1 y ciclofosfamida en el modelo de xenoinjertos de tumor Daudi

Se estabularon ratones hembra SCID beige (CD-1 Beige SCID) de 6-8 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID beige eran desechables, y se adquirieron irradiados de Innovive antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

40

45

Las células de linfoma de Burkitt humano Daudi se obtuvieron originalmente de un paciente humano con linfoma de

5 Burkitt. Las células crioconservadas se descongelaron en un baño de agua a 37<sup>0</sup>C y se cultivaron en medio RPMI-1640 más suero fetal bovino (FBS) al 15%, 1% Penstrep, y 1% Glutamax en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de patógenos con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón). Cuando las células en cultivo alcanzaron el número deseado, se recogieron por centrifugación. Después de la recogida, las células se lavaron con disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en DPBS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección y se inyectaron 20 millones de células por animal suspendidas en 0,1 ml de DPBS subcutáneamente en la región del flanco trasero derecho del ratón después de un mínimo de 7 días de periodo de aclimatación, usando una jeringa de 0,5 cc con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

10 Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

15 
$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

Cuatro semanas después del implante del tumor, los tumores alcanzaron un tamaño medio de 189 ± 47 mm<sup>3</sup>. Los animales con un tamaño y forma tumorales aceptables se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de ocho animales cada uno, utilizando software de separación, un grupo control de vehículo y tres de tratamiento.

Grupos	Número de ratones	Compuestos	Dosis (mg/kg)	Esquema
1	8	Captisol al 30% NS al 0,9%	0	Qd* (lunes-viernes), PO**
2	8	Compuesto 1	75	Qd* (lunes-viernes), PO**
3	8	CTX	50	Día 0, iv
4	8	Compuesto 1 + CTX	75 50	Qd* (lunes-viernes), PO** Día 0, iv

20

\*Qd = Dosificación una vez al día, \*\*PO = Dosificación por sonda gástrica oral, \*\*\*BID, dos veces al día

25 El Compuesto 1 se formuló y se dosificó como sigue: el Compuesto 1 (7,5 mg/ml) se disolvió en Captisol al 30% con 2 equivalentes molares de NaOH, equilibrado con 2 equivalentes molares de HCl, y se dosificó mediante sonda gástrica oral diariamente de lunes a viernes a 75mg/kg. La ciclofosfamida ("CTX") se disolvió en NS al 0,9% a 5 mg/ml, y se dosificó iv (inyección en la vena de la cola) a los animales a 50 mg/kg en el Día 0. El grupo de la combinación se dosificó tanto con el Compuesto 1 como CTX utilizando el mismo esquema de dosificación. El grupo control se dosificó con vehículo (Captisol al 30%) y NS al 0,9% utilizando el mismo paradigma que para la combinación.

30 Durante cada estudio con animales, los tumores se midieron con calibradores, el tamaño tumoral se determinó utilizando la fórmula mencionada anteriormente, y se calcularon los cambios en el tamaño tumoral en porcentaje. Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza dos veces a la semana. Los estudios se continuaron hasta: a) la fecha de fin predeterminada indicada en el diseño del estudio; o b) el inicio de problemas de salud, lo que ocurriera antes. Además, los siguientes parámetros relacionados con tumor justificaron la aplicación de eutanasia: carga tumoral que excede 2.500 mm<sup>3</sup> y/o pérdida de ≥20% del peso corporal de partida. Además de la determinación de los cambios en el tamaño tumoral, la última medida de tumor se utilizó para generar la proporción del cambio en el peso tumoral (valor T/C), una medida estándar desarrollada por el National Cancer Institute (NCI) para la evaluación de xenoinjertos de tumor. Los valores T/C se calcularon utilizando la fórmula siguiente: %T/C = 100 x ΔT/ΔC si ΔT>0. En los casos en los que ocurrió la regresión tumoral, sin embargo, se utilizó la fórmula siguiente: %T/T<sub>0</sub> = 100 x ΔT/T<sub>0</sub> si ΔT<0.

40 El periodo de tratamiento fue 2 semanas. Los tamaños tumorales y pesos corporales se midieron de nuevo en el último día del estudio.

Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 17, que muestra el crecimiento tumoral como una función del tiempo de tratamiento para los grupos control y tratamiento. Como agentes únicos, el Compuesto 1 y ciclofosfamida tienen una actividad similar en este modelo. La combinación de Compuesto 1 y ciclofosfamida mostró

una eficacia sustancialmente mayor que cualquiera de los agentes solo.

**Ejemplo 22: Compuesto 1 en combinación con lenalidomida en el modelo de xenoinjertos de MM1S**

5 Se estabularon ratones hembra SCID/Beige de 4 semanas de edad en jaulas de micro-aislamiento ventiladas (INNOCAGE@IVC, Innovive Inc., San Diego, CA) en un clima controlado, alimentados con dieta rica en grasa estéril (Problab-RMH 2000) *ad libitum* y se les proporcionó agua esterilizada. Todos los alojamientos y suministros para los ratones SCID/Beige se esterilizaron autoclavando antes del uso. Los ratones se inspeccionaron diariamente incluyendo fines de semana/vacaciones por personal entrenado de la instalación animal e investigadores. Todos los procedimientos con animales se realizaron en condiciones estériles en una cabina de bioseguridad (para inyecciones) o cabina de flujo laminar (para cría de animales y procedimientos no invasivos).

10 Las células de MM humanas MM1S crioconservadas se descongelaron en un baño de agua a 37°C y se cultivaron en medio RPMI más suero fetal bovino (FBS) al 10% en un incubador de cultivo tisular con CO<sub>2</sub> al 5%. Las células se mandaron a proveedores externos para cribado de contaminantes y patógenos de roedores con la pretensión de descartar la contaminación por micoplasma (por PCR) y/o virus (por ensayo MAP, Producción de Anticuerpos de Ratón). Cuando las células en cultivo fueron suficientes para implante, se lavaron con disolución salina equilibrada de Hank (HBSS) sin suero. Finalmente, las células se diluyeron en HBSS para implante. Sólo se utilizaron suspensiones de células únicas con más del 90% de viabilidad (por exclusión de azul de tripán) para inyección y se inyectaron 20 millones de células por animal suspendidas en 0,2 ml de HBSS subcutáneamente en la región del flanco trasero derecho del ratón después de un mínimo de 7 días de periodo de aclimatación, usando una jeringa de 1CC con una aguja hipodérmica 26G, teniendo cuidado para evitar los vasos sanguíneos. El implante exitoso se indicó por la formación de una masa redonda, elevada bajo la piel. Los ratones implantados se monitorizaron para salud general y desarrollo de tumor diariamente.

Los tumores fueron detectables aproximadamente dos semanas después del implante. El tamaño tumoral se midió con un calibrador. La fórmula siguiente se utilizó para calcular el volumen tumoral:

$$\text{Volumen tumoral} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$$

25 Tres semanas después del implante del tumor, los tumores alcanzaron una media de 192 ± 32 mm<sup>3</sup>. Los animales con un tamaño y forma tumoral aceptable se asignaron aleatoriamente a 6 grupos de 7 animales cada uno, utilizando software de separación, un grupo de control de vehículo y seis de tratamiento.

Grupos	Número de ratones	Compuestos	Dosis (mg/kg)	Esquema
1	7	Captisol al 30% MCT	0	Qd* (lunes-viernes), PO** Qd* (lunes-viernes), PO**
2	7	Compuesto 1	75	Qd* (lunes-viernes), PO**
3	7	Lenalidomida	12,5	Qd* (lunes-viernes), PO**
4	7	Lenalidomida	12,5	Qd* (lunes-viernes), PO**
5	7	Compuesto 1 + Lenalidomida	75 12,5	Qd* (lunes-viernes), PO** Qd* (lunes-viernes), PO**
6	7	Compuesto 1 + Lenalidomida	75 12,5	Qd* (lunes-viernes), PO** Qd* (lunes-viernes), PO**

30 El Compuesto 1 se formuló y se dosificó como sigue: el Compuesto 1 (7,5 mg/ml) se disolvió en Captisol al 30% con 2 equivalentes molares de NaOH, equilibrado con 2 equivalentes molares de HCl, y se dosificó mediante sonda gástrica oral diariamente de lunes a viernes a 75mg/kg. La lenalidomida (Selleck, 2,5 mg/ml) se formuló en MCT (metil celulosa al 0,5% y Tween80 al 0,2%), y se dosificó a 12,5 mg/kg ó 25 mg/kg. Los dos grupos de combinación se dosificaron con el Compuesto 1 a 75 mg/kg más un nivel de dosis de lenalidomida (bien 12,5 ó 25 mg/kg). El grupo control se dosificó con vehículo (Captisol al 30%) y MCT utilizando el mismo paradigma que para la combinación.

35 Durante cada estudio con animales, los tumores se midieron con calibradores, el tamaño tumoral se determinó utilizando la fórmula mencionada anteriormente, y se calcularon los cambios en el tamaño tumoral en porcentaje. Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza dos veces a la semana. Los estudios se continuaron hasta: a) la fecha de fin predeterminada indicada en el diseño del estudio; o b) el inicio de problemas de salud, lo que ocurriera antes. Además, los siguientes parámetros relacionados con tumor justificaron la aplicación de

5 eutanasia: (1) carga tumoral que excede 2.500 mm<sup>3</sup> y/o (2) pérdida de  $\geq 20\%$  del peso corporal de partida. Además de la determinación de los cambios en el tamaño tumoral, la última medida de tumor se utilizó para generar la proporción del cambio en el peso tumoral (valor T/C), una medida estándar desarrollada por el National Cancer Institute (NCI) para la evaluación de xenoinjertos de tumor. Los valores T/C se calcularon utilizando la fórmula siguiente:  $\%T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$  si  $\Delta T > 0$ . En los casos en los que ocurrió la regresión tumoral, sin embargo, se utilizó la fórmula siguiente:  $\%T/T_0 = 100 \times \Delta T/T_0$  si  $\Delta T < 0$ .

El periodo de tratamiento fue 17 días. Los tamaños tumorales y pesos corporales se midieron de nuevo en el último día del estudio.

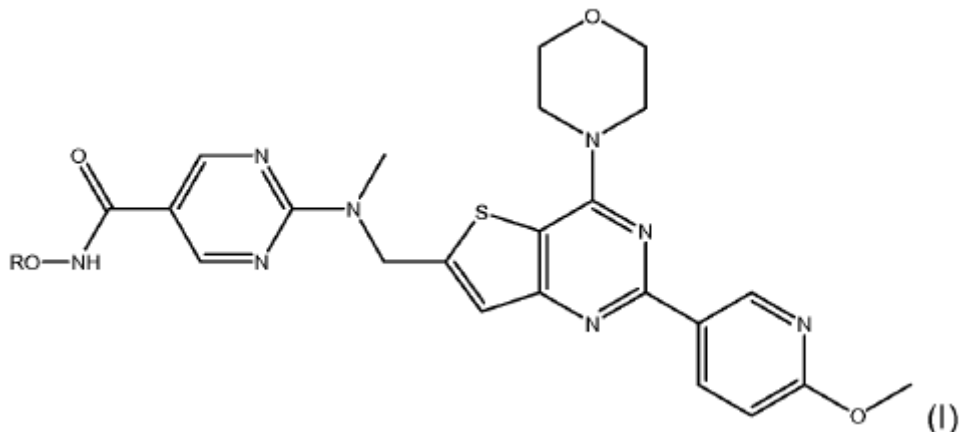
10 Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 18, que muestra el crecimiento tumoral como una función del tiempo de tratamiento. Los resultados muestran que el Compuesto 1 a 75mg/kg PO es más efectivo que Lenalidomida a bien 12,5 ó 25 mg/Kg PO como agentes únicos. Los resultados también muestran que la combinación de Compuesto 1 y lenalidomida es significativamente más efectiva que cualquiera de los dos compuestos solo.

15 La bibliografía de patentes y científica a la que se hace referencia en la presente establece el conocimiento que está disponible para los expertos en la técnica. Todas las patentes de los Estados Unidos y solicitudes de patente de los Estados Unidos publicadas o no publicadas citadas en la presente se incorporan por referencia. Todas las patentes y solicitudes de patente extranjeras publicadas citadas en la presente se incorporan por la presente por referencia. Todas las demás referencias, documentos, manuscritos y bibliografía científica publicada citada en la presente se incorporan por la presente por referencia.

20 Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con referencias a las realizaciones preferidas de la misma, los expertos en la técnica entenderán que pueden hacerse varios cambios en la forma y detalles a la misma sin apartarse del alcance de la invención englobada por las reivindicaciones adjuntas.

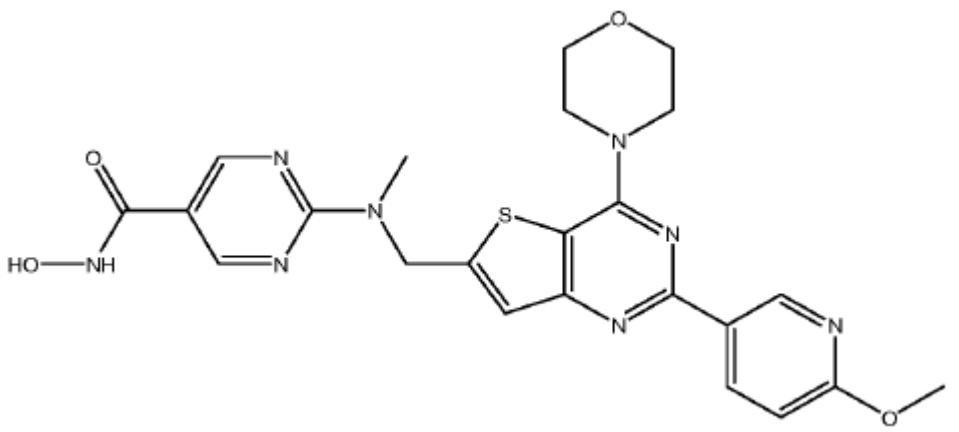
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R es hidrógeno o un grupo acilo.

- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1 donde R es  $R_1C(O)-$ , donde  $R_1$  es alquilo- $C_1-C_{24}$  sustituido o no sustituido; alquenilo- $C_2-C_{24}$  sustituido o no sustituido; alquínilo- $C_2-C_{24}$  sustituido o no sustituido; arilo sustituido o no sustituido; o heteroarilo sustituido o no sustituido.
3. El compuesto de la reivindicación 2 donde  $R_1$  es alquilo- $C_1-C_6$  sustituido o no sustituido o alquenilo- $C_2-C_6$  sustituido o no sustituido.
- 10 4. El compuesto de la reivindicación 1 donde R es H o acetilo.
5. El compuesto de la reivindicación 1 representado por la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 6. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende como un ingrediente activo un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo un compuesto de la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 9. Una composición farmacéutica para administración oral que comprende como un ingrediente activo un compuesto de la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con PI3K en un sujeto que lo necesita.

- 5 11. La composición para uso según la reivindicación 10, donde dicha enfermedad o trastorno relacionado con PI3K es un trastorno proliferativo celular, preferiblemente donde el trastorno proliferativo celular es un cáncer, tal como papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Burkitt.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por HDAC o para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada tanto por PI3K como HDAC.
- 10 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con PI3K en un sujeto que lo necesita.
- 15 14. La composición para uso según la reivindicación 12 donde dicha enfermedad o trastorno relacionado con PI3K es un trastorno proliferativo celular, preferiblemente donde el trastorno proliferativo celular es un cáncer, tal como papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Burkitt.
15. La composición farmacéutica de la reivindicación 8 para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por HDAC, o para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada tanto por PI3K como HDAC.

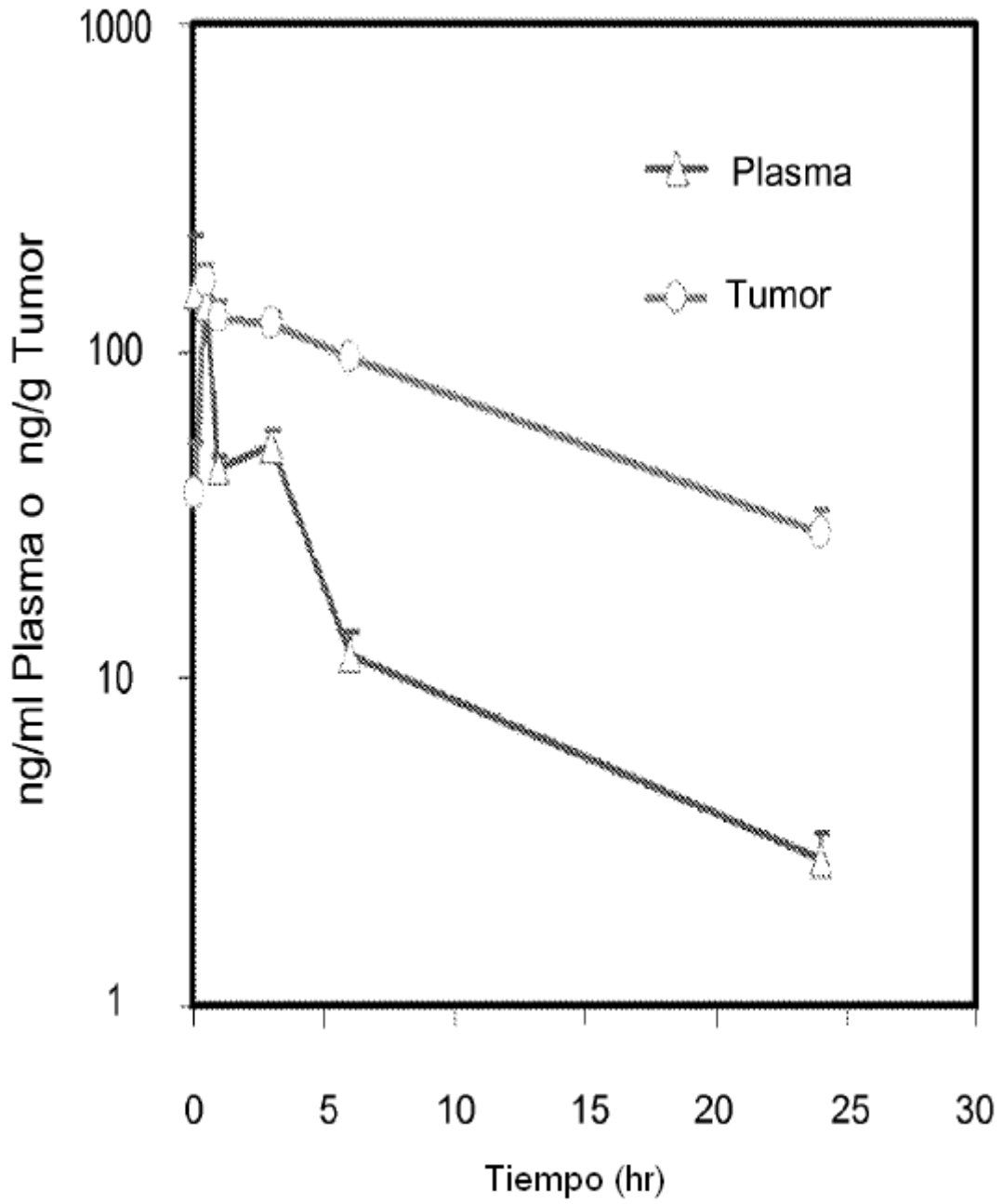


FIG. 1

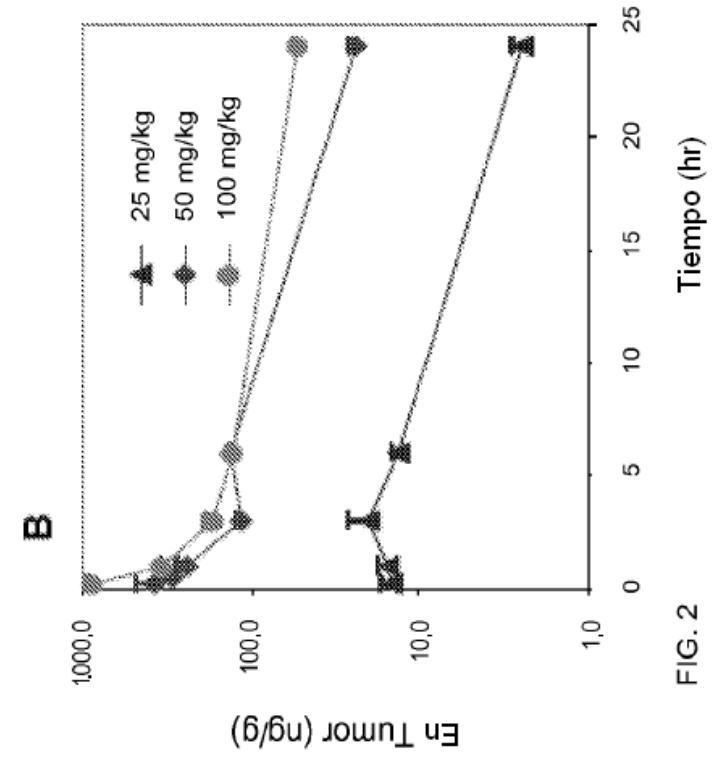
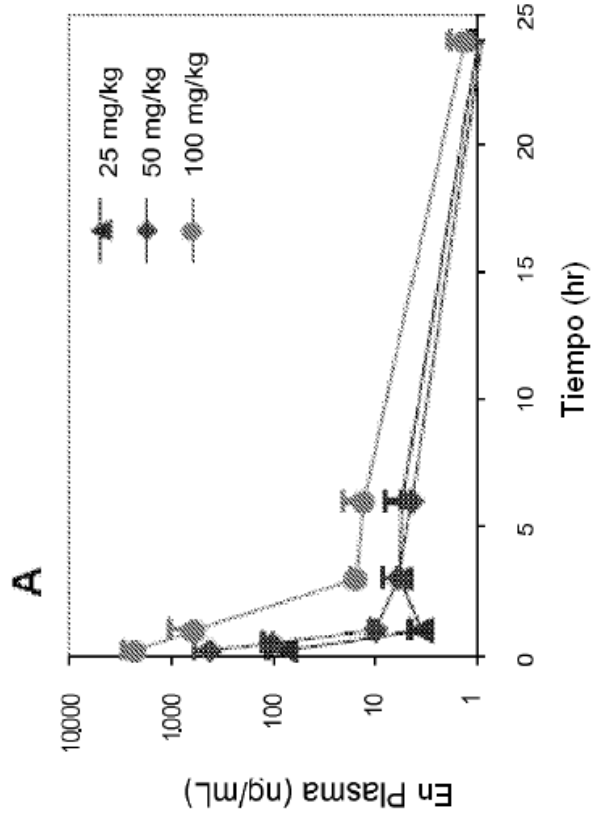


FIG. 2





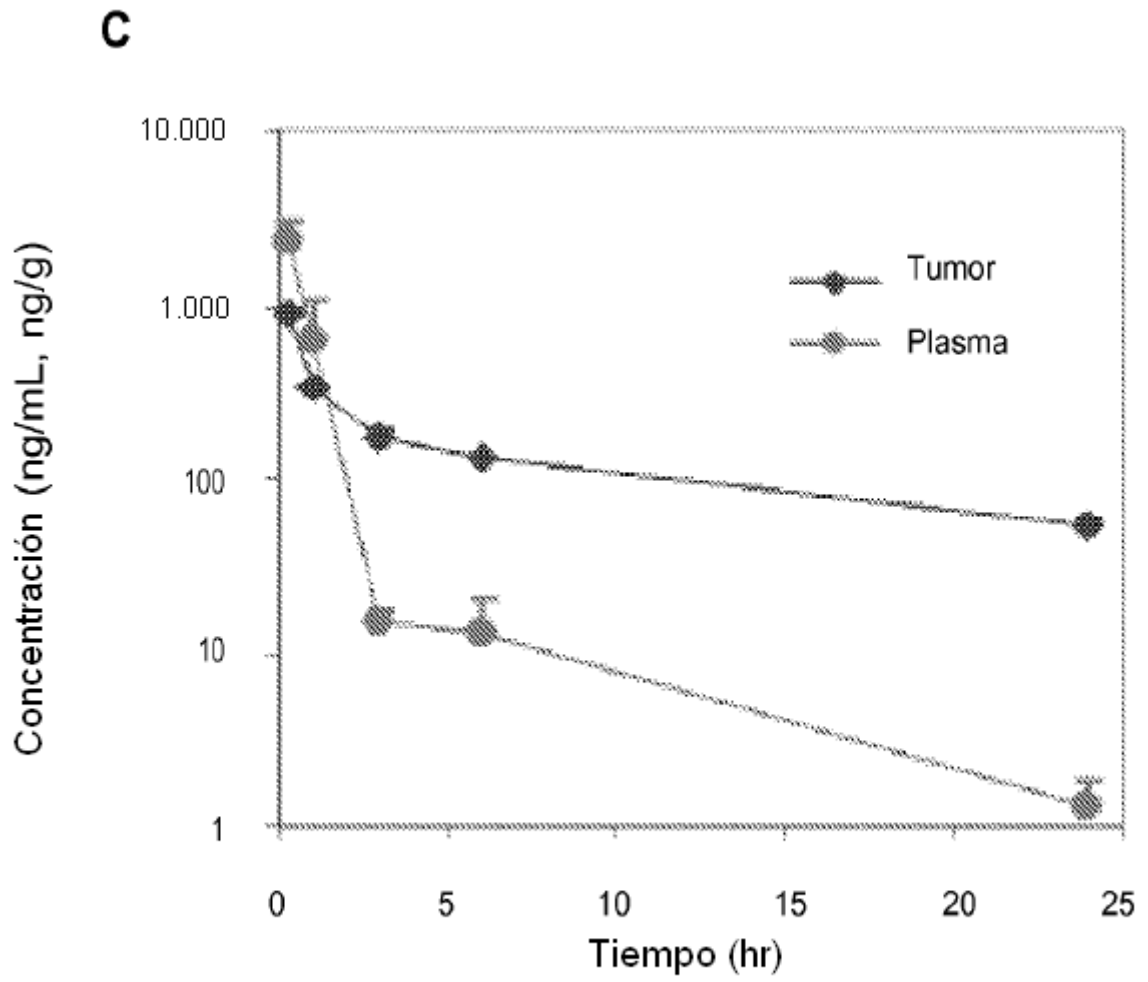


FIG. 2 cont...

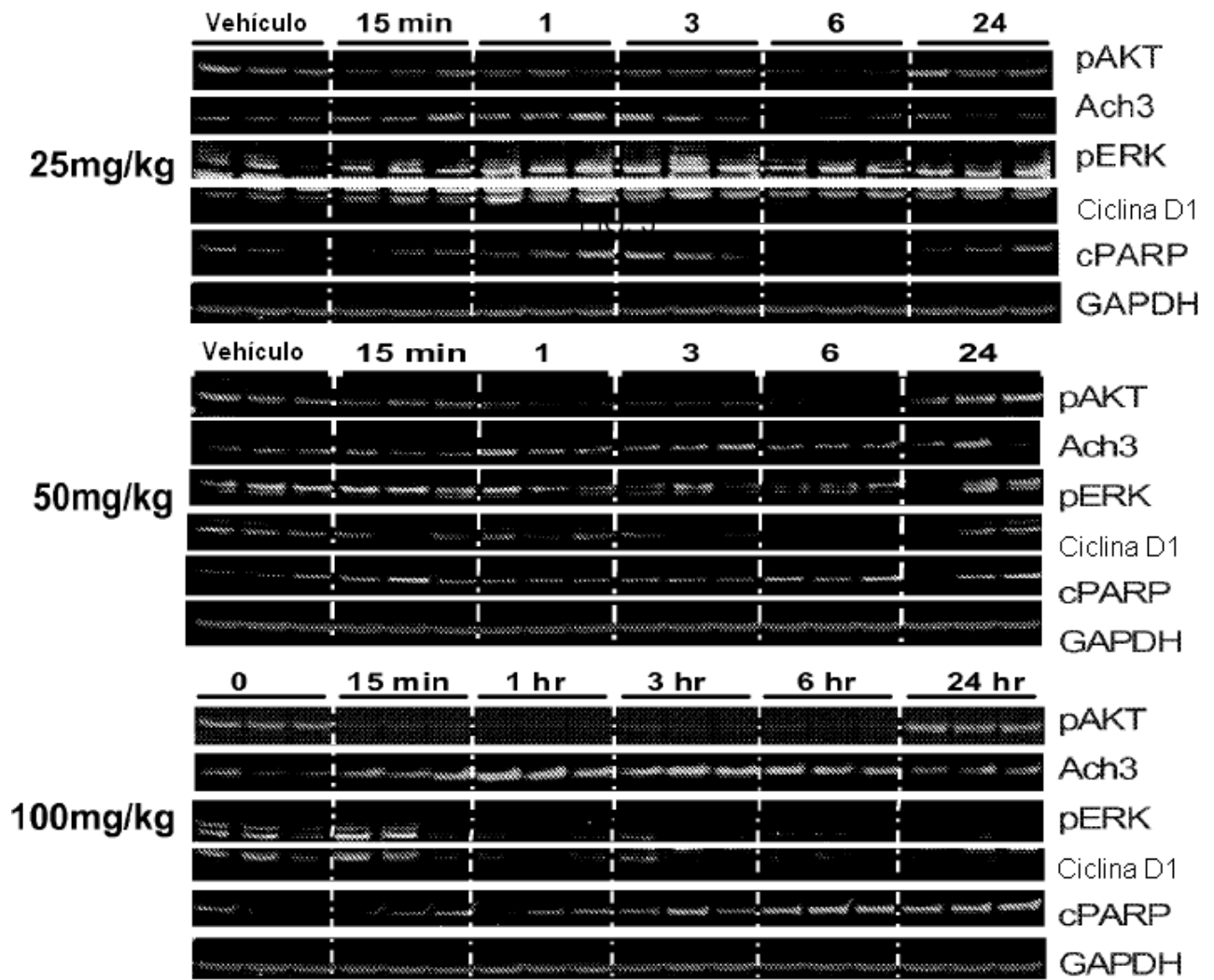


FIG. 3

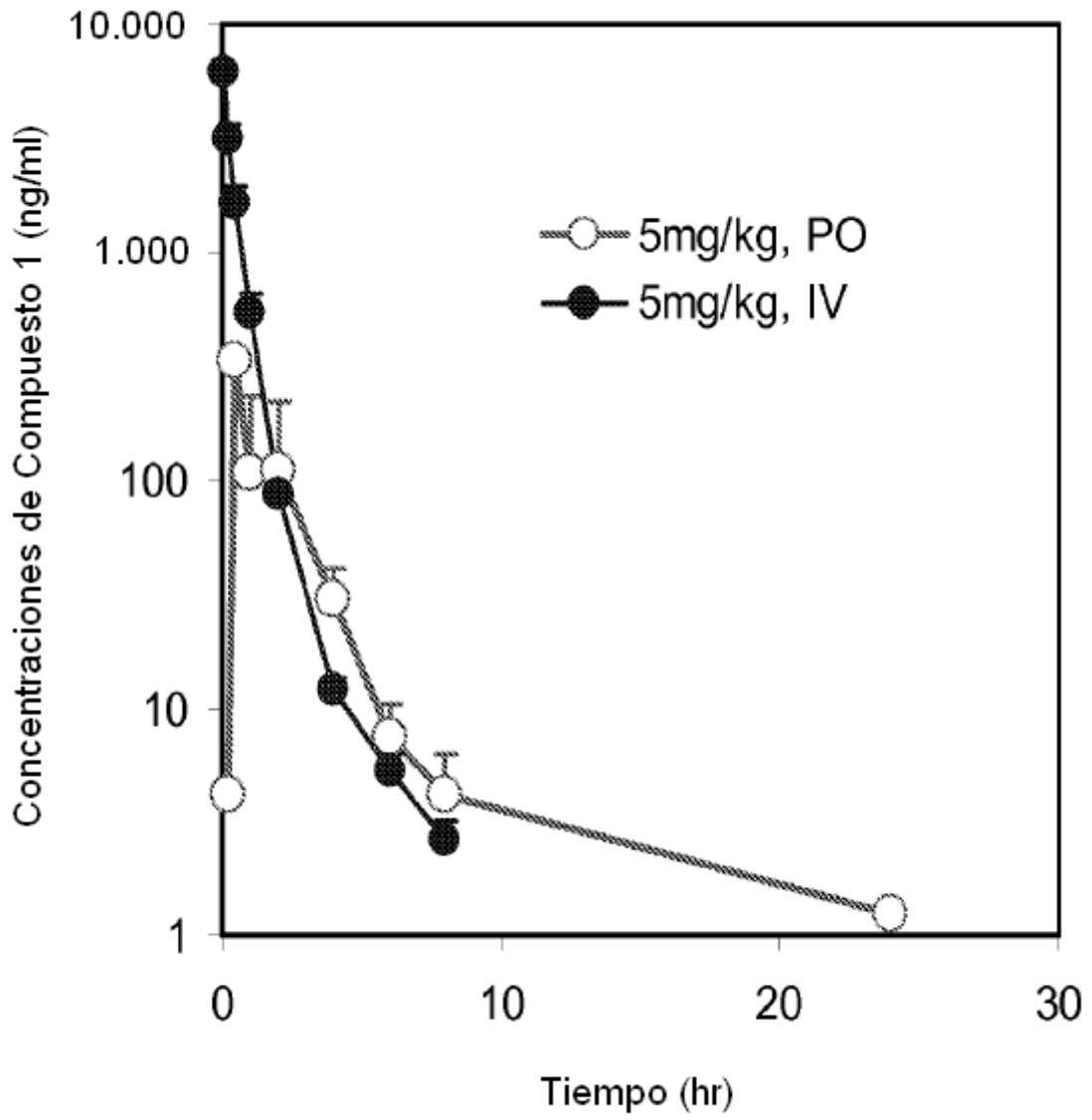


FIG. 4

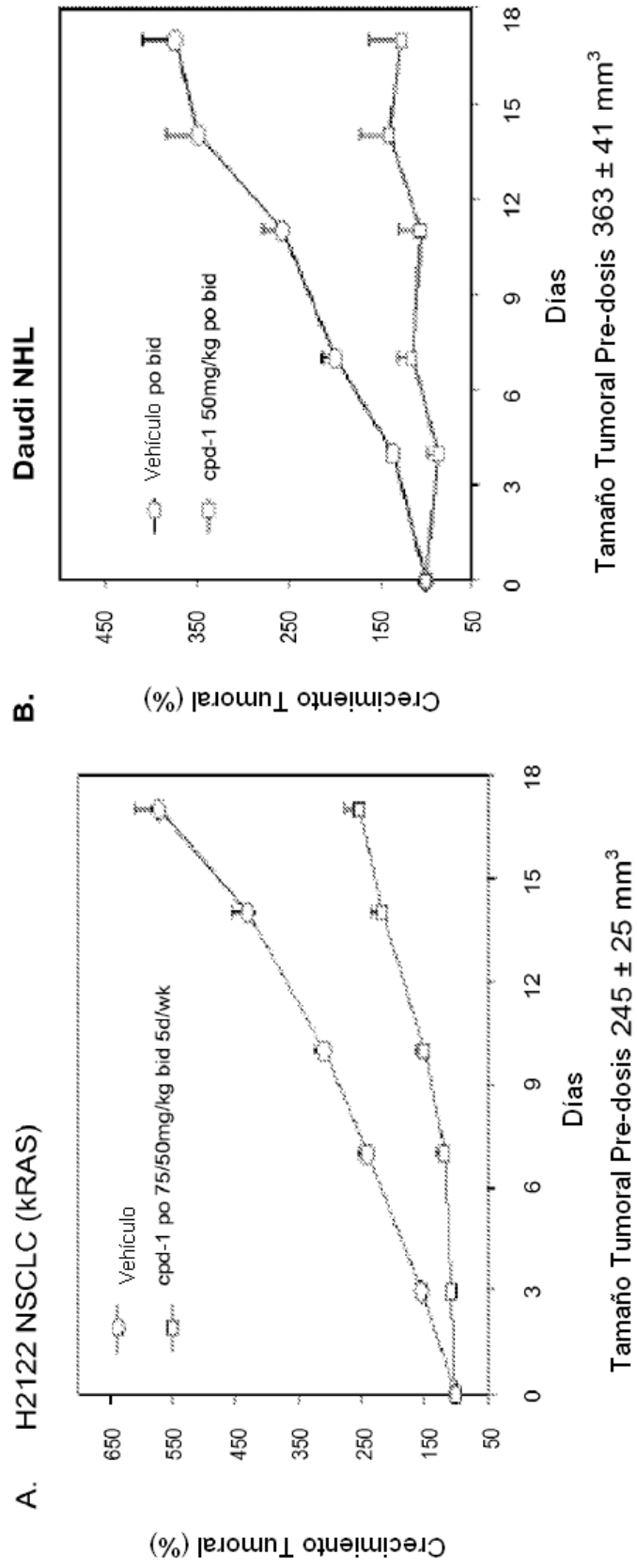
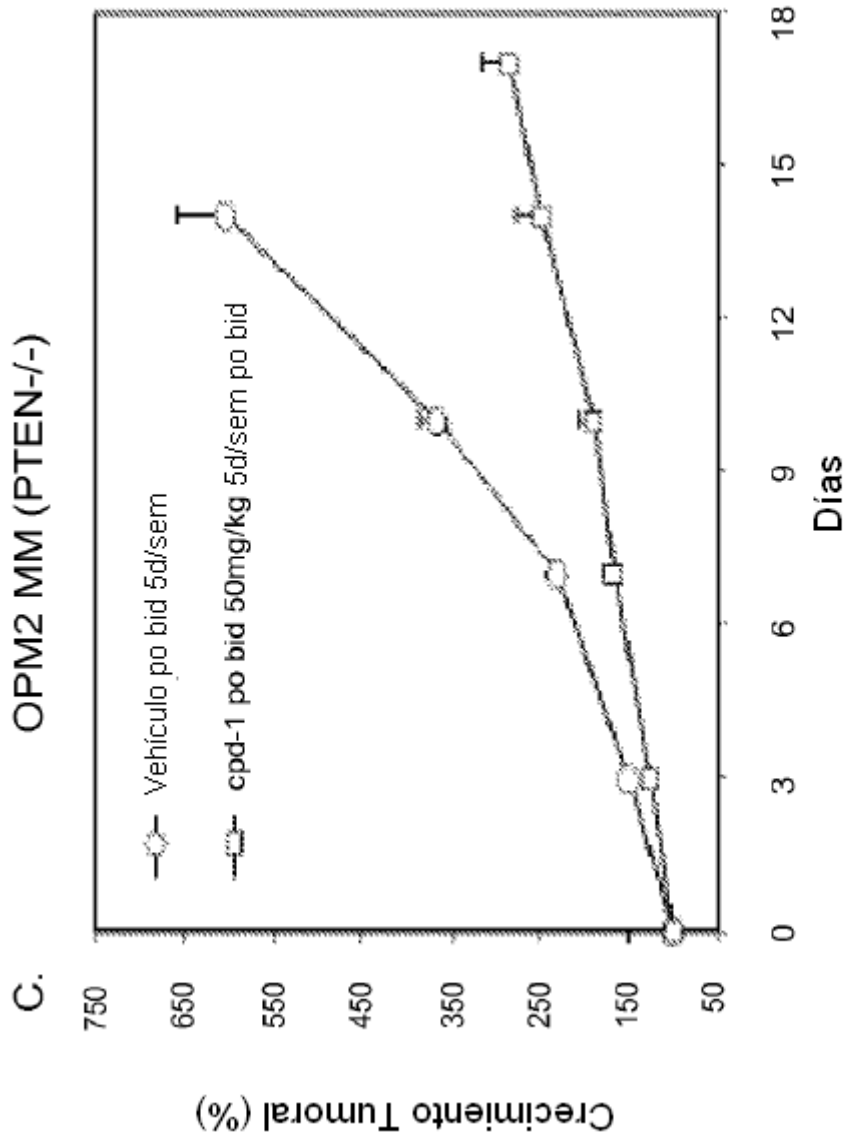


FIG. 5



Tamaño Tumoral Pre-dosis  $318 \pm 52 \text{ mm}^3$

FIG. 5 cont...

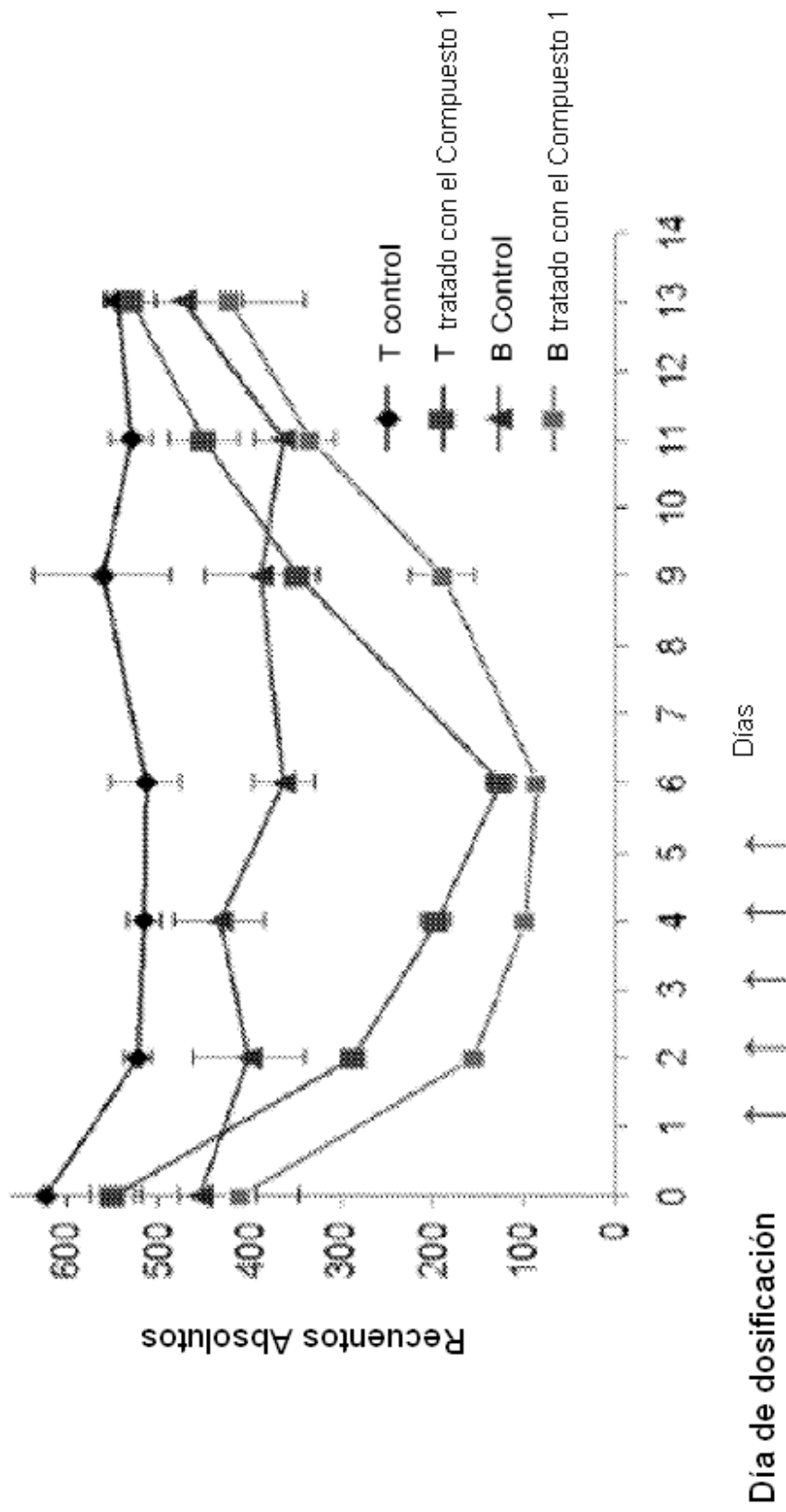


FIG. 6

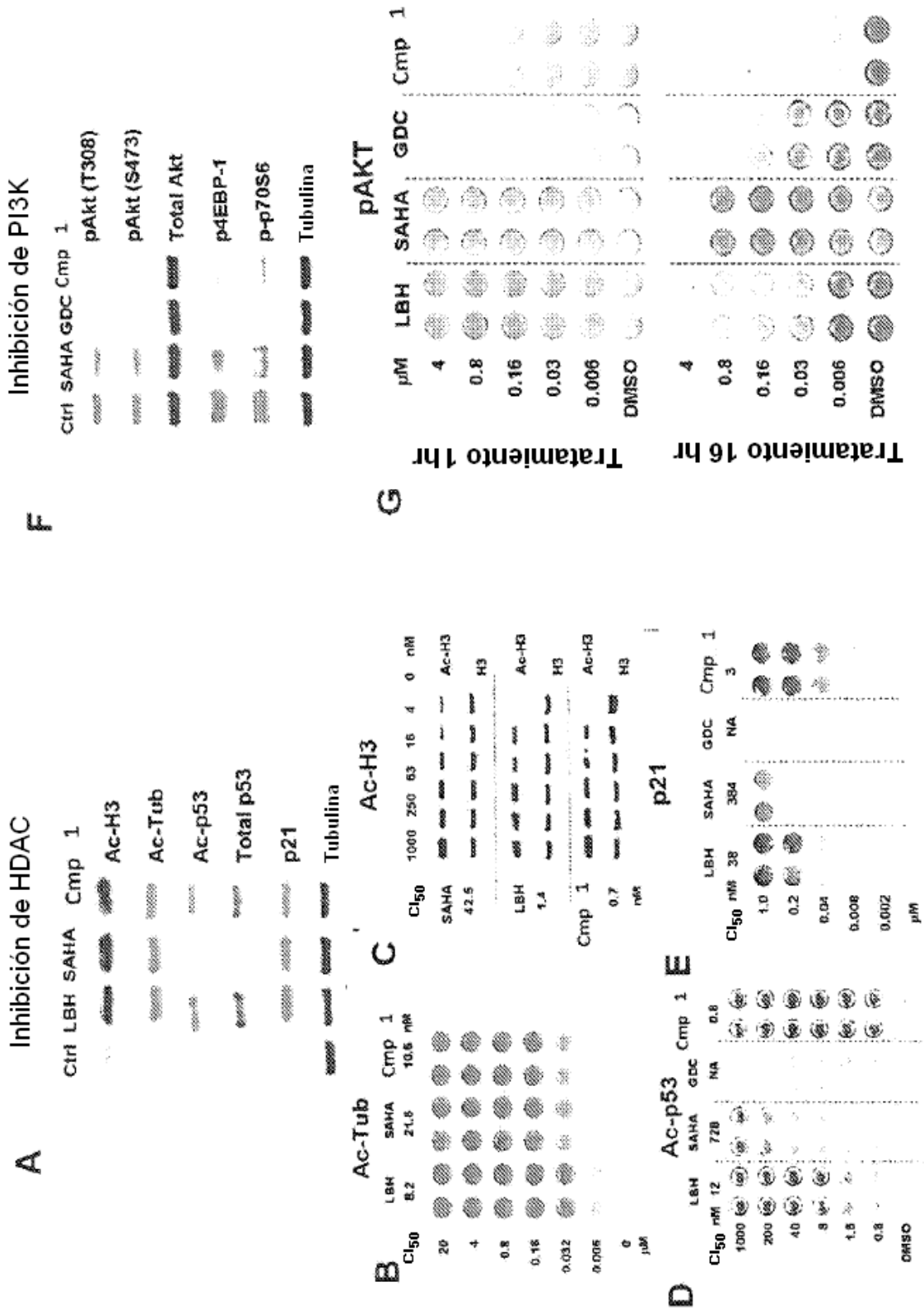


FIG. 7

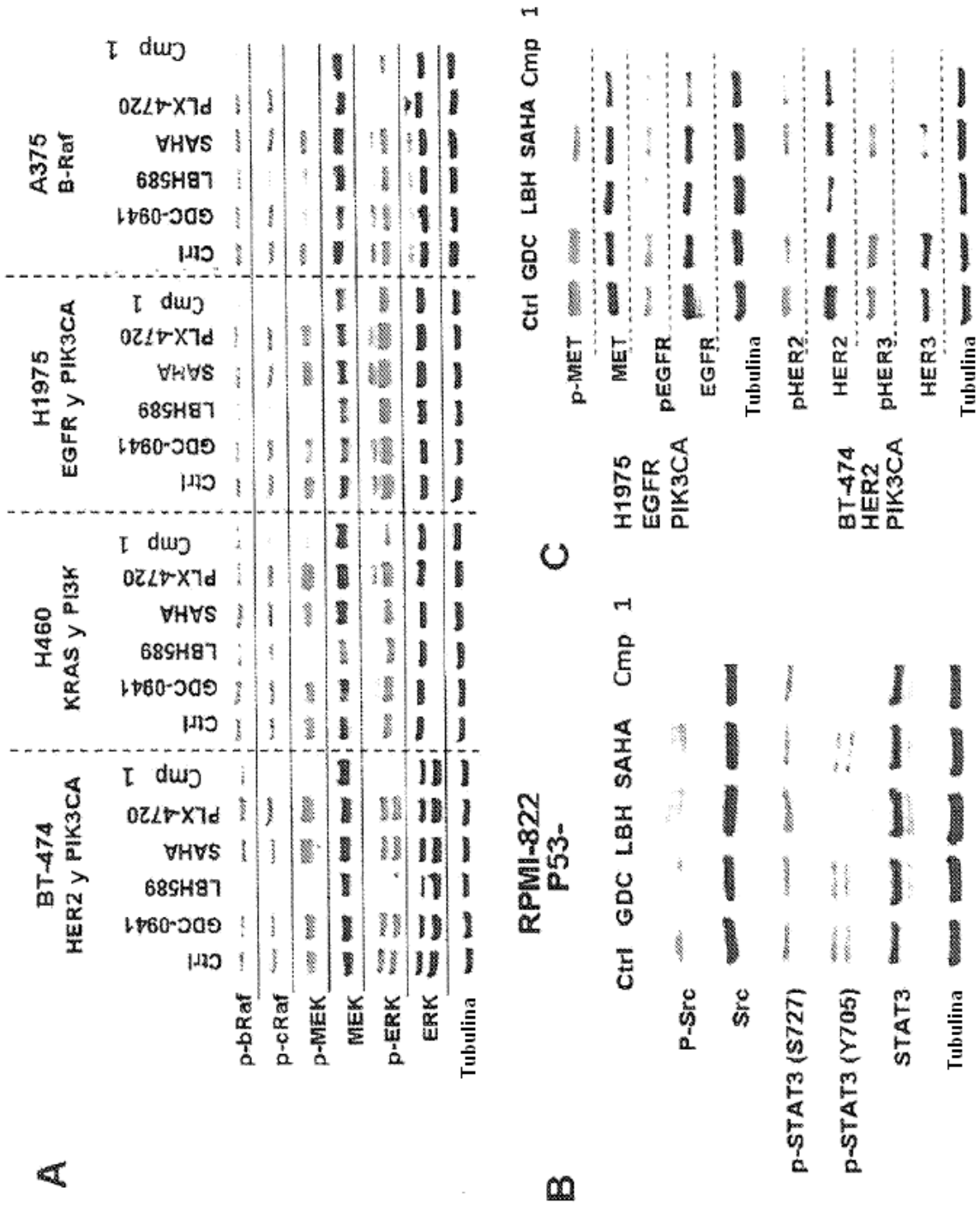


FIG. 8



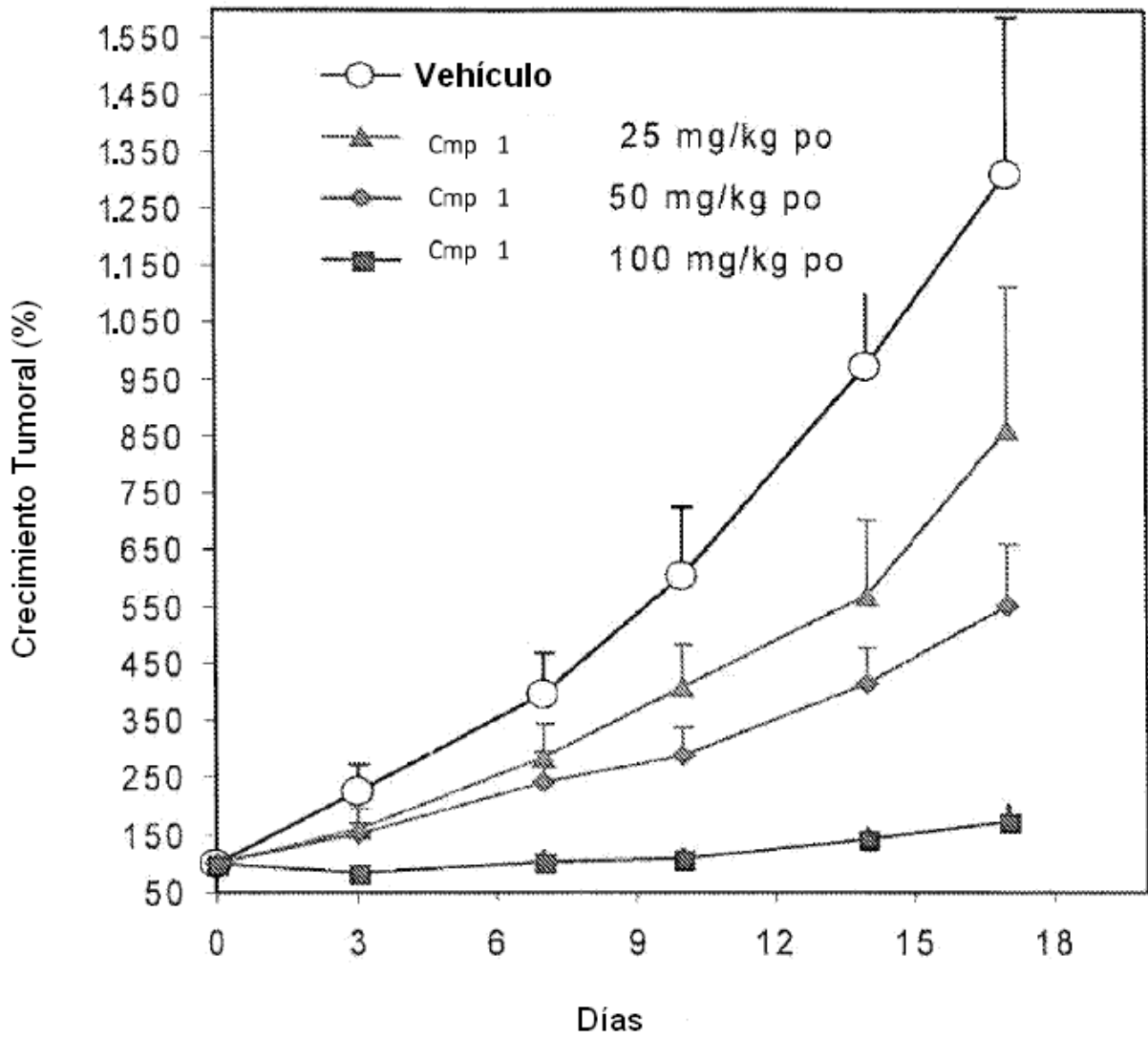


FIG. 9

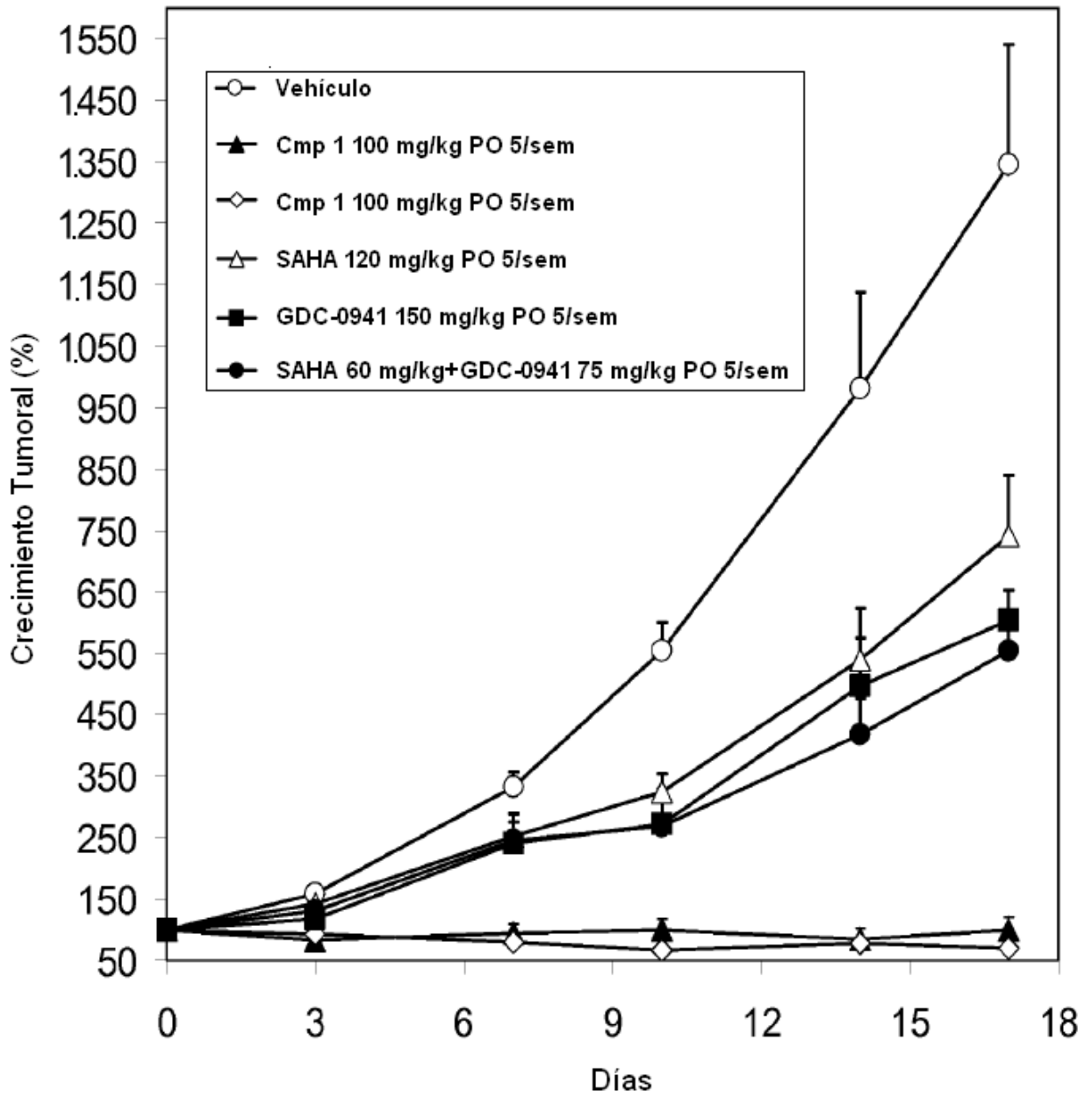


FIG. 10

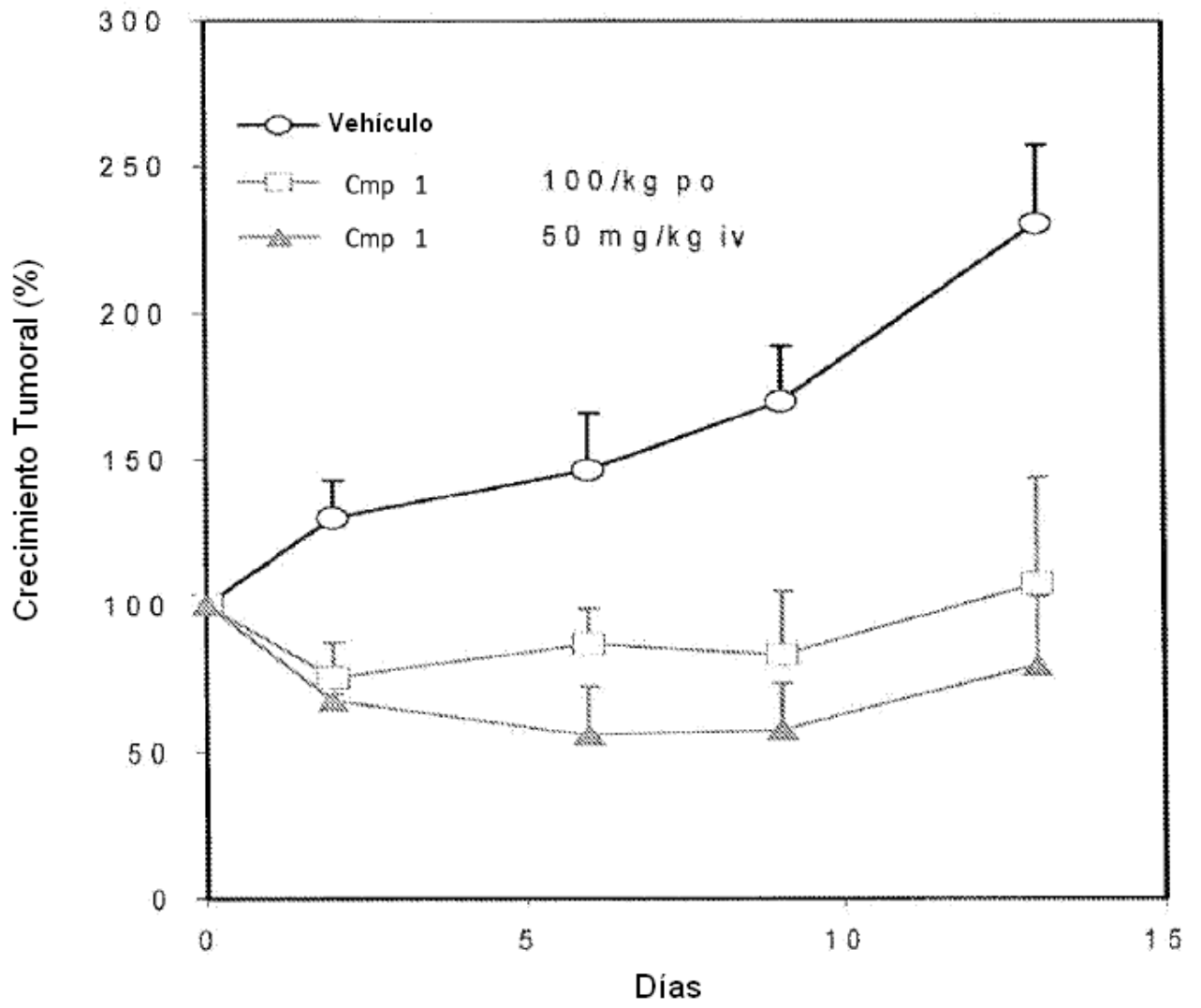


FIG. 11

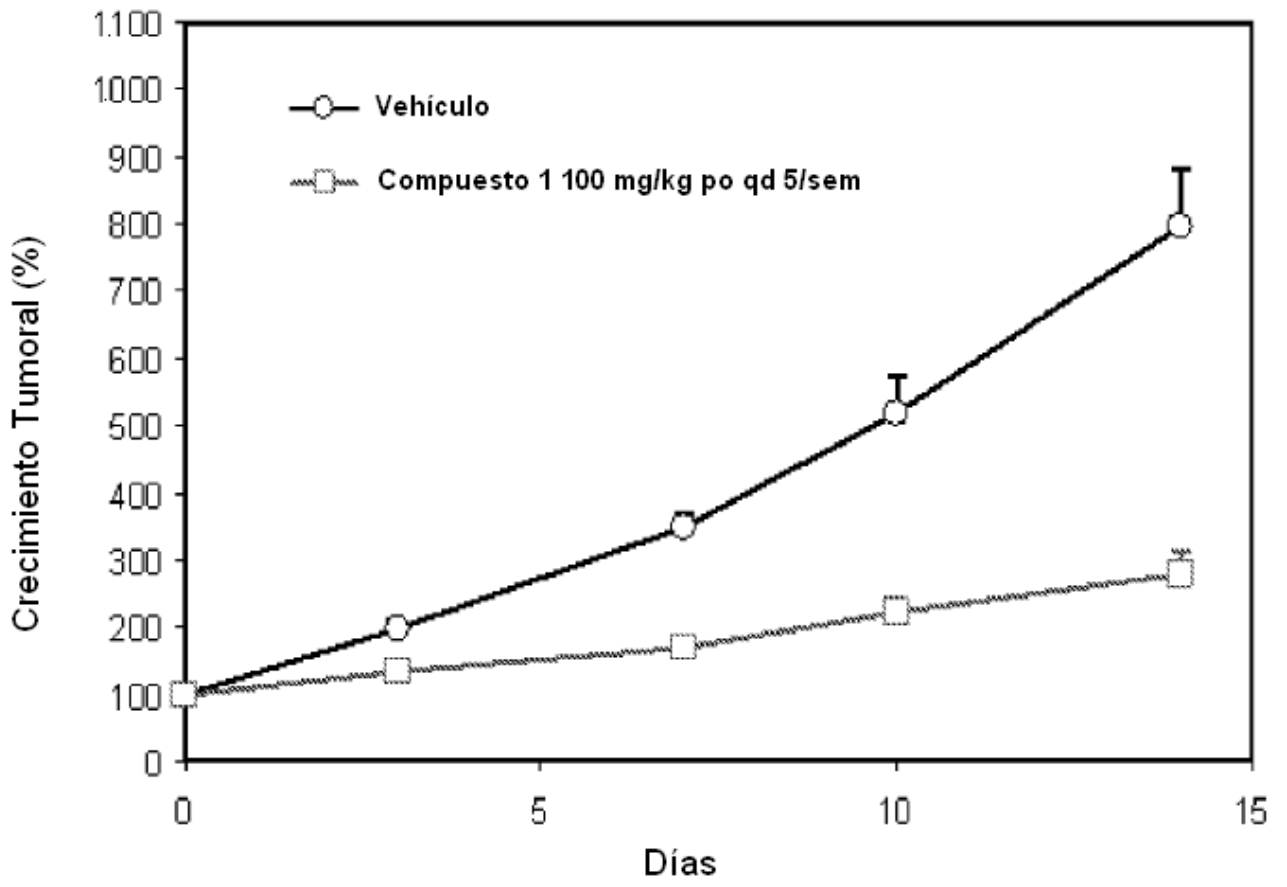


FIG. 12

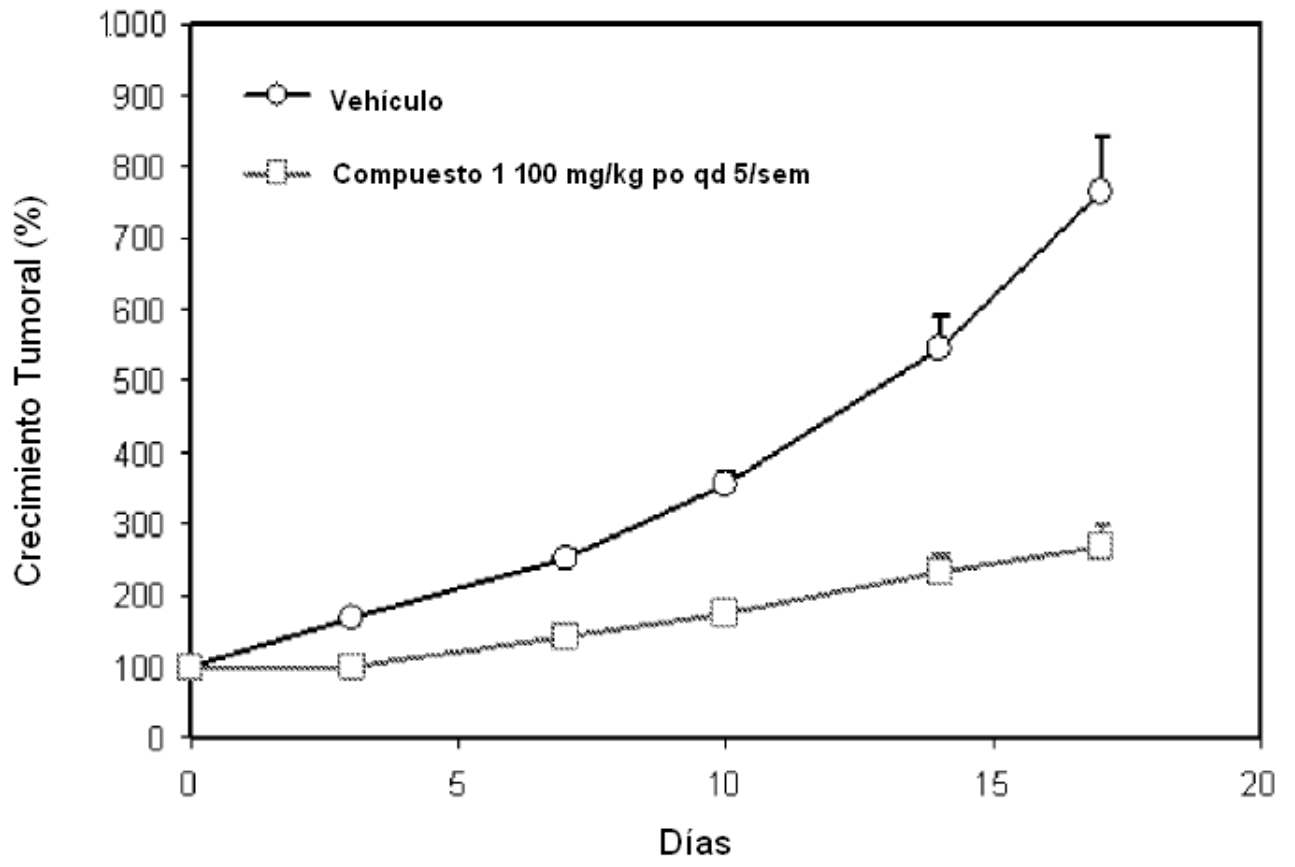


FIG. 13

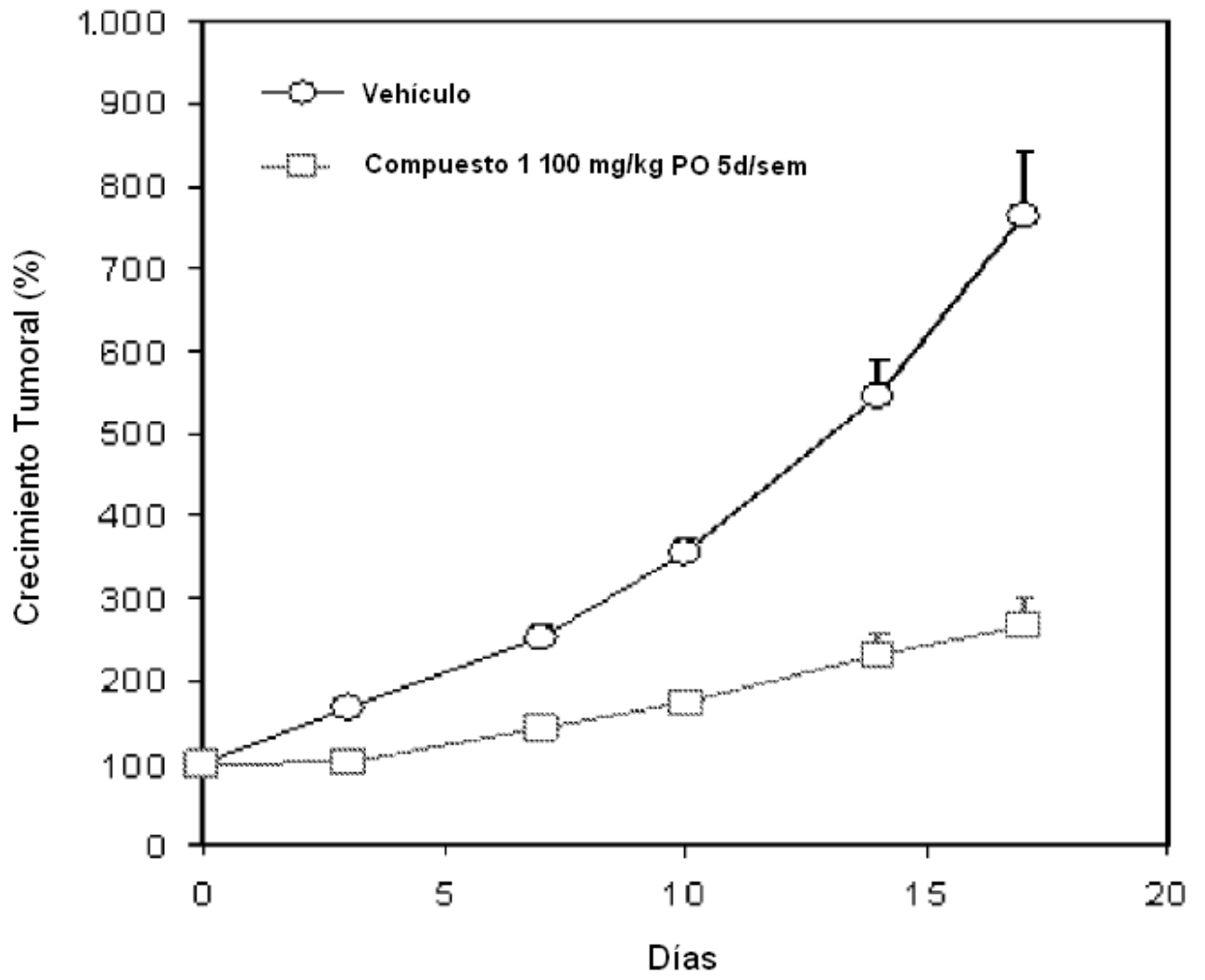


FIG. 14

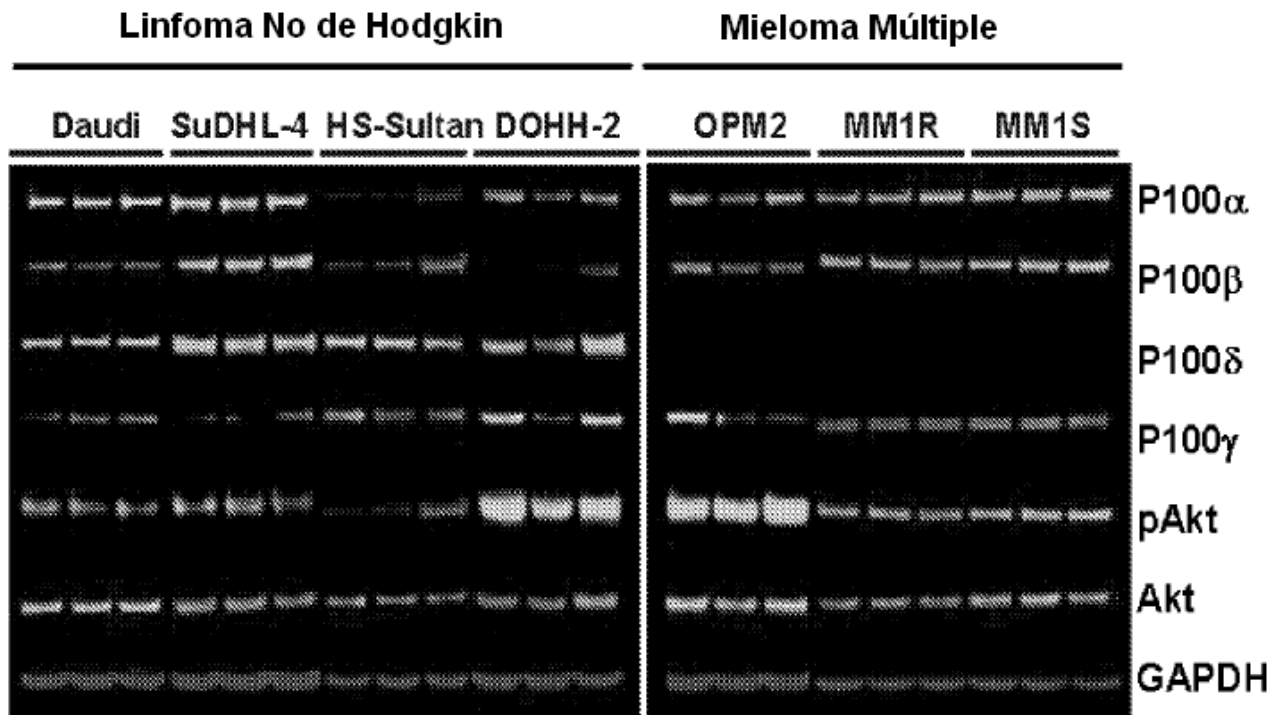


FIG. 15

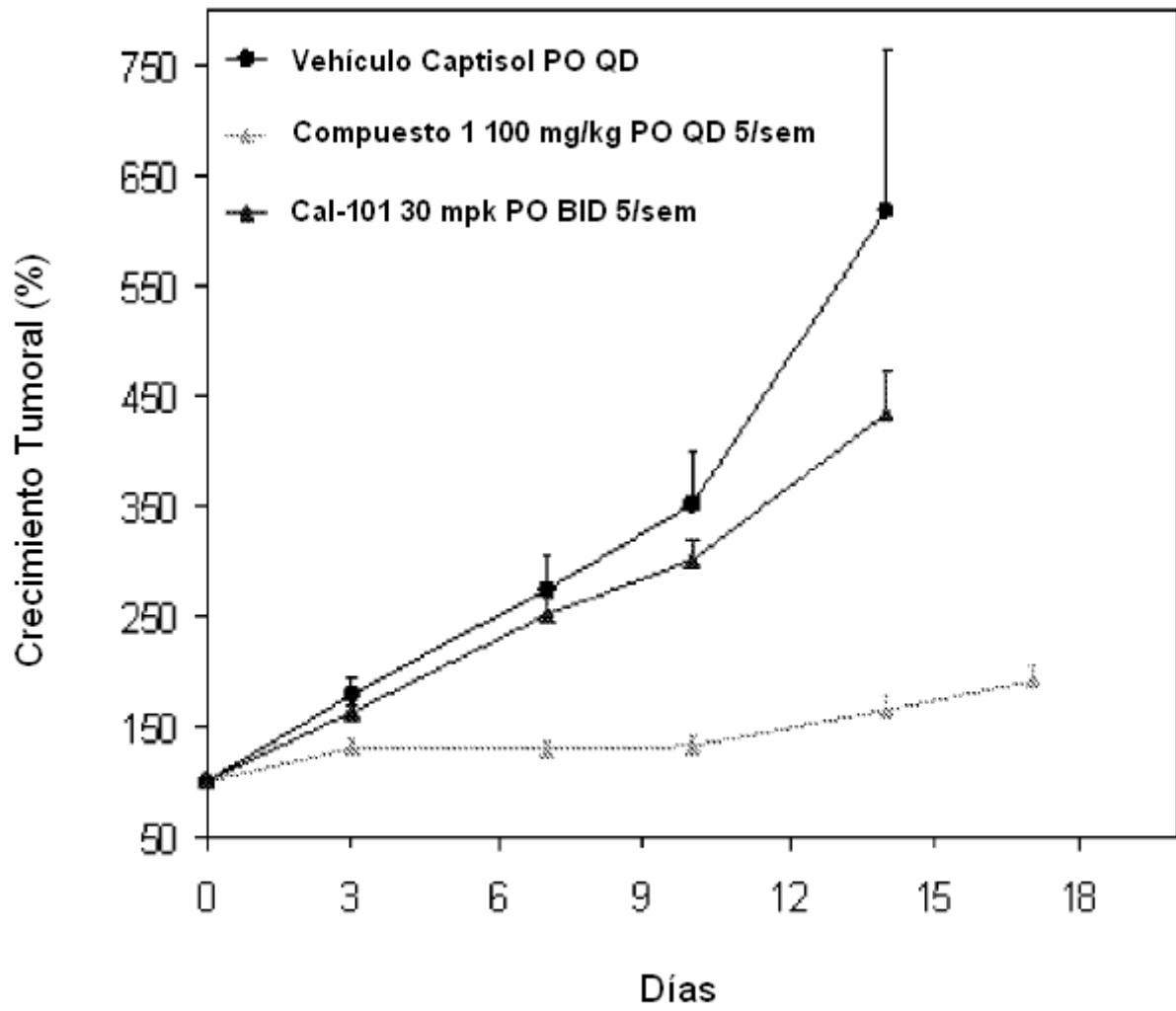


FIG. 16



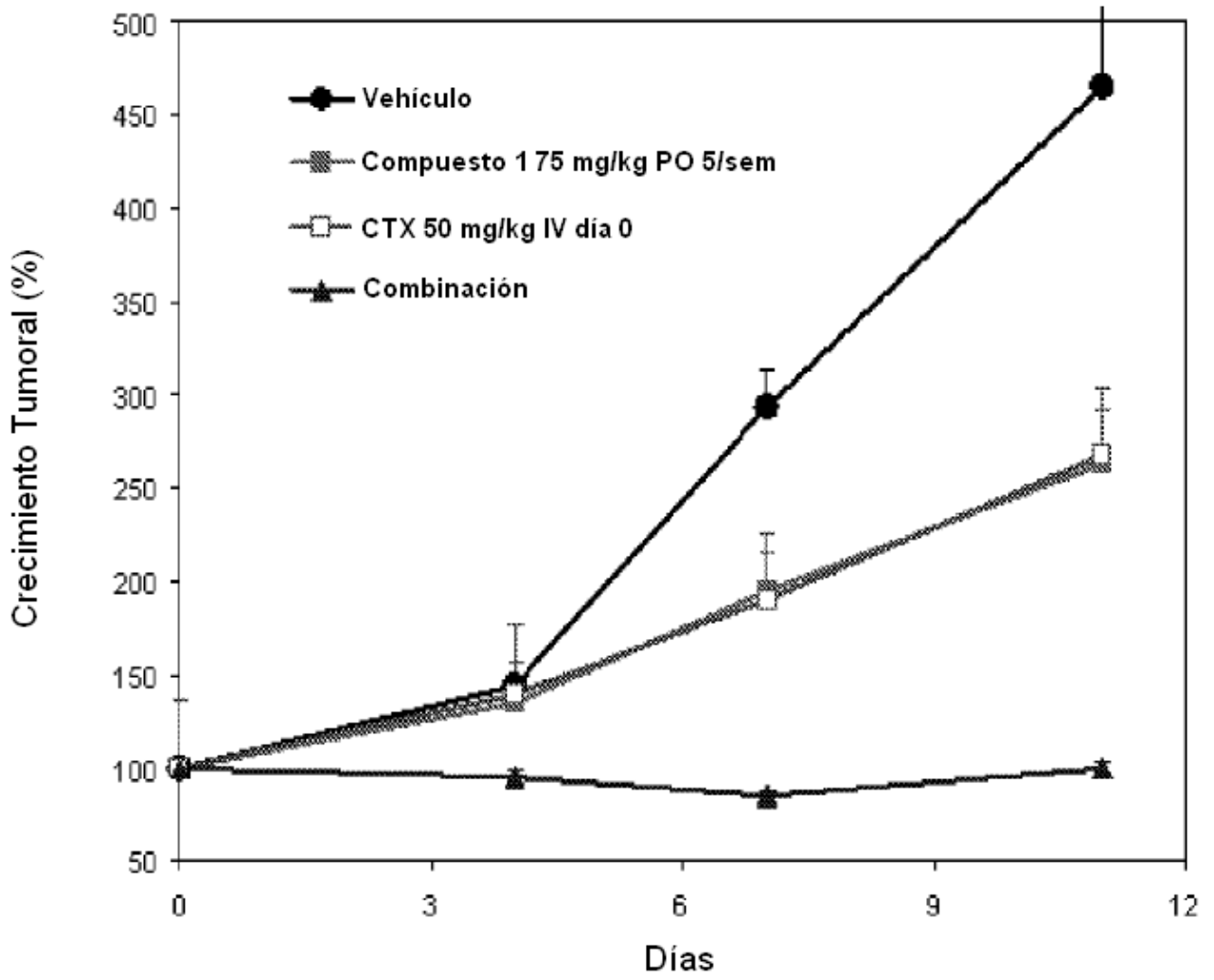


FIG. 17

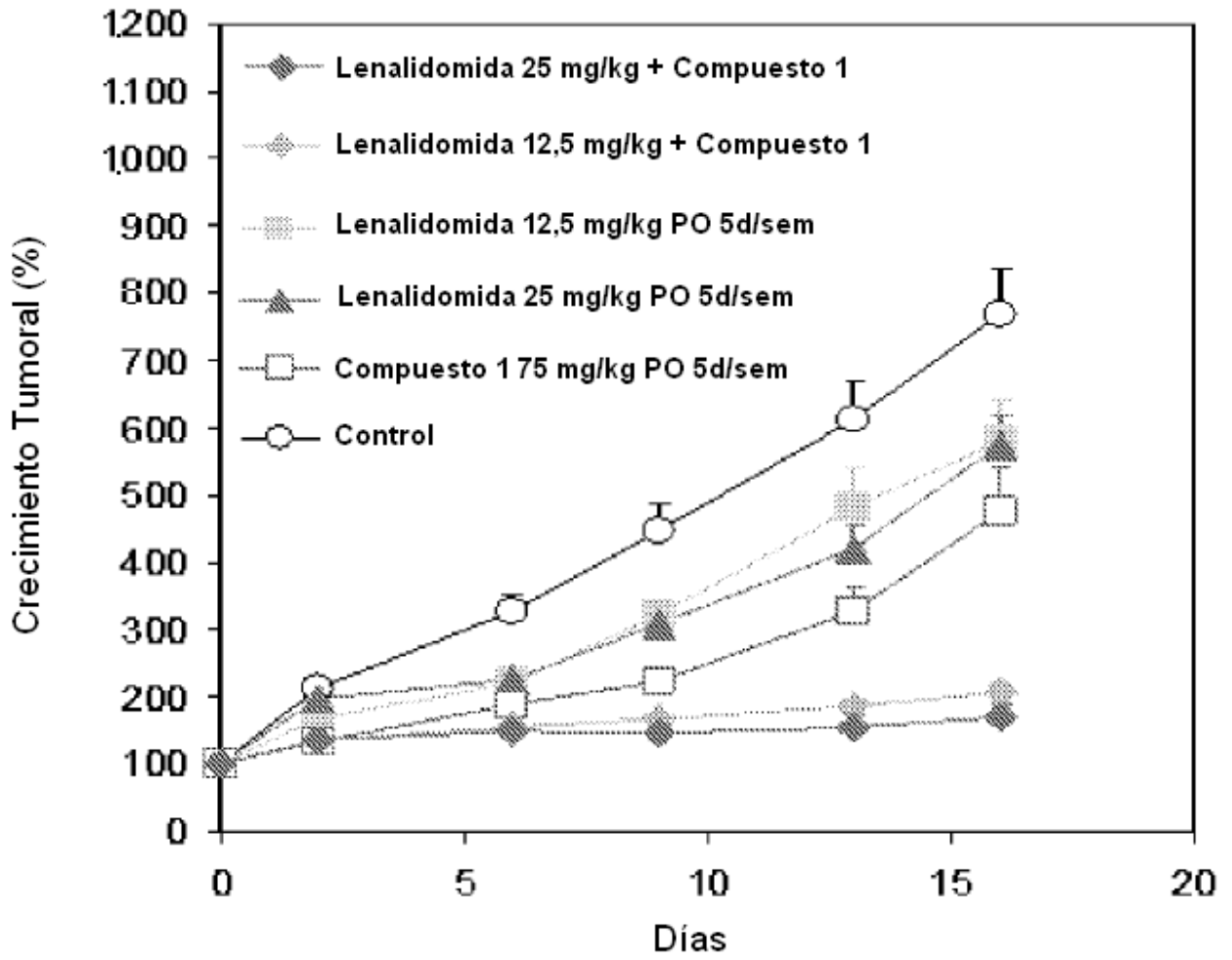


FIG. 18