

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 197**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2009 PCT/US2009/005959**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051043**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09823947 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2365750**

54 Título: **Inhibidores de benzoxazol quinasa y métodos de uso**

30 Prioridad:

**31.07.2009 US 230655 P**  
**20.04.2009 US 214261 P**  
**03.11.2008 US 198200 P**  
**17.09.2009 US 586241**  
**16.12.2008 US 201923 P**  
**17.09.2009 US 586309**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**31.10.2016**

73 Titular/es:

**INTELLIKINE, INC. (100.0%)**  
**10931 North Torrey Pines Road, Suite 103**  
**La Jolla, CA 92037, US**

72 Inventor/es:

**REN, PINGDA;**  
**LIU, YI;**  
**LI, LIANSHENG;**  
**CHAN, KATRINA y**  
**WILSON, TROY, EDWARD**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones :**

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

**ES 2 588 197 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

Inhibidores de benzoxazol quinasa y métodos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

La actividad de las células puede regularse mediante señales externas que estimulan o inhiben acontecimientos intracelulares. El proceso mediante el cual se transmiten señales estimuladoras o inhibitoras hacia el interior o dentro de una célula para suscitar una respuesta intracelular se denomina transducción de señal. Durante las  
10 últimas décadas, se han esclarecido cascadas de acontecimientos de transducción de señales y se ha descubierto que desempeñan una función importante en diversas respuestas biológicas. Se ha descubierto que los defectos en varios componentes de las rutas de transducción de señales explican una gran cantidad de enfermedades, entre las que se incluyen numerosas formas de cáncer, trastornos inflamatorios, trastornos metabólicos, enfermedades vasculares y neuronales (Gaestel et al. *Current Medicinal Chemistry* (2007) 14: 2214-2234).

Las quinasas representan una clase de moléculas de señalización importantes. Generalmente, las quinasas pueden clasificarse en proteína quinasas y lípido quinasas, y determinadas quinasas presentan doble especificidad. Las proteína quinasas son enzimas que fosforilan a otras proteínas y/o a ellas mismas (es decir, autofosforilación). Generalmente, las proteína quinasas pueden clasificarse en tres grupos principales en función de su utilización del  
20 sustrato: las tirosina quinasas que predominantemente fosforilan sustratos sobre restos de tirosina (por ejemplo, erb2, receptor de PDGF, receptor de EGF, receptor de VEGF, src, abl), las serina/treonina quinasas que predominantemente fosforilan sustratos sobre restos de serina y/o treonina (por ejemplo, mTorC1, mTorC2, ATM, ATR, ADN-PK, Akt), y las quinasas con doble especificidad que fosforilan sustratos sobre restos de tirosina, serina y/o treonina.

Las lípido quinasas son enzimas que catalizan la fosforilación de lípidos. Estas enzimas, y los lípidos fosforilados resultantes y moléculas orgánicas biológicamente activas derivadas de lípidos, desempeñan una función en muchos procesos fisiológicos diferentes, entre los que se incluyen la proliferación, migración, adhesión y diferenciación celular. Determinadas lípido quinasas están asociadas a la membrana y catalizan la fosforilación de lípidos  
30 contenidos en, o asociados con, las membranas celulares. Como ejemplos de dichas enzimas se incluyen las fosfoinositida quinasas (tales como PI3-quinasas, PI4-quinasas), las diacilglicerol quinasas y las esfingosina quinasas.

La ruta de señalización de las fosfoinositida 3-quinasas (PI3K) es uno de los sistemas más altamente mutados en los cánceres humanos. La señalización de PI3K es también un factor clave en muchos otros trastornos en seres humanos. La señalización de PI3K interviene en muchas patologías entre las que se incluyen, la dermatitis alérgica por contacto, la artritis reumatoide, la artrosis, las enfermedades intestinales inflamatorias, el trastorno pulmonar obstructivo crónico, la soriasis, la esclerosis múltiple, el asma, trastornos relacionados con complicaciones diabéticas y complicaciones inflamatorias del sistema cardiovascular, tal como el síndrome coronario agudo.

Las PI3K son miembros de una familia única y conservada de lípido quinasas intracelulares que fosforilan el grupo 3'-OH sobre fosfatidilinositoles o fosfoinositidas. La familia PI3K comprende 15 quinasas con distintas especificidades de sustrato, patrones de expresión y modos de regulación (Katso et al., 2001). La clase I de las PI3K (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  y p110 $\gamma$ ) está típicamente activada por receptores de tirosina quinasas o acoplados a proteína G para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), que activan efectores aguas abajo tales como en la ruta Akt/PDK1, mTOR, la familia Tec quinasas y la familia Rho GTPasas. Las PI3-K de clase II y III desempeñan un papel clave en el tránsito intracelular a través de la síntesis de PI(3)P y PI(3,4)P<sub>2</sub>. Las PIKK son proteína quinasas que controlan el crecimiento celular (mTORC1) o vigilan la integridad genómica (ATM, ATR, ADN-PK y hSmg-1).

La producción de PIP<sub>3</sub> inicia fuertes señales de crecimiento y de supervivencia. En algunos cánceres epiteliales la ruta PI3K está activada por mutación genética directa. Dado que la ruta de señalización de PI3K desempeña una función importante en la proliferación y diferenciación celular, se piensa que la inhibición de esta ruta es beneficiosa en enfermedades hiperproliferativas.

Como mediadores aguas abajo de la ruta de transducción de señal de PI3K se incluyen Akt y la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR, por sus siglas en inglés *mammalian Target of Rapamycin*). La Akt posee un dominio de homología con Pleckstrina (PH) que se une a PIP<sub>3</sub>, lo que conduce a la activación de la Akt quinasa. La Akt fosforila muchos sustratos y es un importante efector aguas abajo de PI3K para respuestas celulares diversas. La activación completa de Akt requiere típicamente la fosforilación de T308 en el bucle de activación y S473 en un motivo hidrófobo. Una función importante de la Akt es aumentar la actividad de mTOR, a través de la fosforilación de TSC2 y otros mecanismos.

mTOR es una serina-treonina quinasa relacionada con las lípido quinasas de la familia PI3K. mTOR se ha implicado en una amplia serie de procesos biológicos entre los que se incluye el crecimiento celular, la proliferación celular, la motilidad celular y la supervivencia. La mala regulación de la ruta de mTOR se ha descrito en diversos tipos de cáncer. mTOR es una quinasa multifuncional que integra señales de nutrientes y de factores de crecimiento que

regulan la traducción de proteínas, captación de nutrientes, autofagia y función mitocondrial.

mTOR existe en dos complejos, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 contiene la subunidad *raptor* (por las siglas en inglés, *regulatory associated protein of mTOR*) y mTORC2 contiene rictor (por las siglas en inglés, *rapamycin-insensitive companion of mTOR*). Estos complejos están regulados de un modo diferente y tienen distintas especificidades de sustrato y sensibilidad a la rapamicina. Por ejemplo, mTORC1 fosforila la S6 quinasa (S6K) y 4EBP1, promoviendo la traducción aumentada y la biogénesis de ribosomas para facilitar el crecimiento celular y la progresión del ciclo celular. La S6K también actúa en una ruta de retroalimentación para atenuar la activación de PI3K/Akt. mTORC2 es generalmente insensible a la rapamicina. Se piensa que mTORC2 modula la señalización de factores de crecimiento fosforilando el motivo hidrófobo C-terminal de algunas AGC quinasas tales como Akt. En muchos contextos celulares, mTORC2 se requiere para la fosforilación del sitio S473 de Akt.

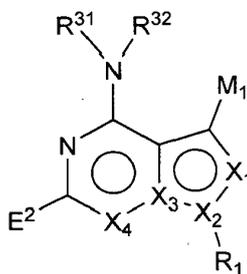
Durante la última década, se ha prestado considerable atención a mTOR debido a su función en el control del crecimiento celular y a su intervención en enfermedades humanas. mTOR se ha implicado en una amplia serie de trastornos, entre los que se incluyen, pero sin limitación, cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares y trastornos neurológicos. Se ha mostrado que mTOR modula muchos procesos biológicos fundamentales, entre los que se incluyen la transcripción, la traducción, la autofagia, la organización de la actina y la biogénesis de los ribosomas integrando señales intracelulares y extracelulares, tales como señales mediadas por factores de crecimiento, nutrientes, niveles de energía y estrés celular.

Como tales, las quinasas, particularmente las proteína quinasas tales como mTor y Akt, así como las lípido quinasas, tales como PI3K, son dianas excelentes para el desarrollo de fármacos. La presente invención trata esta necesidad en la técnica proporcionando una nueva clase de inhibidores de quinasas.

El documento US 2007/293517 desvela inhibidores de PI3-quinasa y su uso médico en el tratamiento del cáncer. El documento US 2008/112005 desvela inhibidores de mTOR que son útiles en el tratamiento del cáncer.

### Resumen de la invención

La invención proporciona el compuesto y su uso como un medicamento como se define en las reivindicaciones. También se desvelan compuestos de



Fórmula I'-A'

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que:

X<sub>1</sub> es N o C-E<sup>1</sup>, X<sub>2</sub> es N, X<sub>3</sub> es C, y X<sub>4</sub> es C-R<sup>9</sup> o N; o X<sub>1</sub> es N o C-E<sup>1</sup>, X<sub>2</sub> es C, X<sub>3</sub> es N, y X<sub>4</sub> es C-R<sup>9</sup> o N;

R<sub>1</sub> es H, -L-alquilo C<sub>1-10</sub>, -L-cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, -L-alquil C<sub>1-10</sub>-cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, -L-arilo, -L-heteroarilo, -L-alquilarilo C<sub>1-10</sub>, -L-alquilheteroarilo C<sub>1-10</sub>, -L-alquilheterociclilo C<sub>1-10</sub>, -L-alquenilo C<sub>2-10</sub>, -L-alquinilo C<sub>2-10</sub>, -L-alquenil C<sub>2-10</sub>-cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, -L-alquinil C<sub>2-10</sub>-cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, -L-heteroalquilo, -L-heteroalquilarilo, -L-heteroalquilheteroarilo, -L-heteroalquilheterociclilo, -L-heteroalquil-cicloalquilo C<sub>3-8</sub>, -L-aralquilo, -L-heteroaralquilo o -L-heterociclilo, cada uno de los cuales está sin sustituir o sustituido con uno o más R<sup>3</sup> independientes;

L está ausente, -(C=O)-, -C(=O)O-, -C(=O)N(R<sup>31</sup>)-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R<sup>31</sup>)- o -N(R<sup>31</sup>)-;

M<sub>1</sub> es benzoxazolilo sustituido con -(W<sup>2</sup>)<sub>k</sub>-R<sup>2</sup> o bencisoxazolilo sustituido con -(W<sup>2</sup>)<sub>k</sub>-R<sup>2</sup>;

k es 0 o 1;

E<sup>1</sup> y E<sup>2</sup> son independientemente -(W<sup>1</sup>)<sub>j</sub>-R<sup>4</sup>;

j en E<sup>1</sup> o j en E<sup>2</sup>, es independientemente 0 o 1;

W<sup>1</sup> es -O-, -NR<sup>7</sup>-, -S(O)<sub>0-2</sub>-, -C(O)-, -C(O)N(R<sup>7</sup>)-, -N(R<sup>7</sup>)C(O)-, -N(R<sup>7</sup>)S(O)-, -N(R<sup>7</sup>)S(O)<sub>2</sub>-, -C(O)O-, -CH(R<sup>7</sup>)N(C(O)OR<sup>8</sup>)-, -CH(R<sup>7</sup>)N(C(O)R<sup>8</sup>)-, -CH(R<sup>7</sup>)N(SO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>)-, -CH(R<sup>7</sup>)N(R<sup>8</sup>)-, -CH(R<sup>7</sup>)C(O)N(R<sup>8</sup>)-, CH(R<sup>7</sup>)N(R<sup>8</sup>)C(O)-,



sustituir o está sustituido con uno o más  $-NR^{31}R^{32}$ , hidroxilo, halógeno, oxo, arilo, heteroarilo, alquilo  $C_{1-6}$  o O-arilo, y en la que dicho anillo saturado o insaturado de 3-10 miembros contiene independientemente 0, 1 o 2 más heteroátomos además del átomo de nitrógeno;

5 cada uno de  $R^7$  y  $R^8$  es independientemente hidrógeno, alquilo  $C_{1-10}$ , alquenoilo  $C_{2-10}$ , arilo, heteroarilo, heterociclilo o cicloalquilo  $C_{3-10}$ , cada uno de los cuales, excepto para hidrógeno, está sin sustituir o está sustituido con uno o más  $R^6$  independientes;

10  $R^6$  es halo,  $-OR^{31}$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ,  $-NR^{34}R^{35}$ ,  $-NR^{31}R^{32}$ ,  $-CO_2R^{31}$ ,  $-CO_2$ arilo,  $-C(=O)NR^{31}R^{32}$ ,  $C(=O)NR^{34}R^{35}$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $-S(O)_{0-2}$  alquilo  $C_{1-10}$ ,  $-S(O)_{0-2}$ arilo,  $-SO_2NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{31}R^{32}$ , alquilo  $C_{1-10}$ , alquenoilo  $C_{2-10}$ , alquinilo  $C_{2-10}$ ; aril-alquilo  $C_{1-10}$ , aril-alquenoilo  $C_{2-10}$ , aril-alquinilo  $C_{2-10}$ , heteroaril-alquilo  $C_{1-10}$ , heteroaril-alquenoilo  $C_{2-10}$ , heteroaril-alquinilo  $C_{2-10}$ , en la que cada uno de dicho grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, heteroalquilo, heterociclilo o heteroarilo está sin sustituir o está sustituido con uno o más halo, ciano, nitro,  $-O$ alquilo  $C_{1-10}$ , alquilo  $C_{1-10}$ , alquenoilo  $C_{2-10}$ , alquinilo  $C_{2-10}$ , haloalquilo  $C_{1-10}$ , haloalquenoilo  $C_{2-10}$ , haloalquinilo  $C_{2-10}$ ,  $-COOH$ ,  $-C(=O)NR^{31}R^{32}$ ,  $-C(=O)NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{31}R^{32}$ ,  $-NR^{31}R^{32}$ , o  $-NR^{34}R^{35}$  independientes; y

20  $R^9$  es H, halo,  $-OR^{31}$ ,  $-SH$ ,  $-NH_2$ ,  $-NR^{34}R^{35}$ ,  $-NR^{31}R^{32}$ ,  $-CO_2R^{31}$ ,  $-CO_2$ arilo,  $-C(=O)NR^{31}R^{32}$ ,  $C(=O)NR^{34}R^{35}$ ,  $-NO_2$ ,  $-CN$ ,  $-S(O)_{0-2}$  alquilo  $C_{1-10}$ ,  $-S(O)_{0-2}$ arilo,  $-SO_2NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{31}R^{32}$ , alquilo  $C_{1-10}$ , alquenoilo  $C_{2-10}$ , alquinilo  $C_{2-10}$ ; aril-alquilo  $C_{1-10}$ , aril-alquenoilo  $C_{2-10}$ , aril-alquinilo  $C_{2-10}$ , heteroaril-alquilo  $C_{1-10}$ , heteroaril-alquenoilo  $C_{2-10}$ , heteroaril-alquinilo  $C_{2-10}$ , en la que cada uno de dicho grupo alquilo, alquenoilo, alquinilo, arilo, heteroalquilo, heterociclilo o heteroarilo está sin sustituir o está sustituido con uno o más halo, ciano, nitro,  $-O$ alquilo  $C_{1-10}$ , alquilo  $C_{1-10}$ , alquenoilo  $C_{2-10}$ , alquinilo  $C_{2-10}$ , haloalquilo  $C_{1-10}$ , haloalquenoilo  $C_{2-10}$ , haloalquinilo  $C_{2-10}$ ,  $-COOH$ ,  $-C(=O)NR^{31}R^{32}$ ,  $-C(=O)NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{34}R^{35}$ ,  $-SO_2NR^{31}R^{32}$ ,  $-NR^{31}R^{32}$  o  $-NR^{34}R^{35}$  independientes.

25 En algunas de las realizaciones del compuesto para su uso en los métodos de la invención, la invención tiene lugar en un sujeto que padece un trastorno seleccionado del grupo que consiste en cáncer, enfermedad renal, trastorno óseo, enfermedad inflamatoria, enfermedad inmunitaria, enfermedad del sistema nervioso, enfermedad metabólica, enfermedad respiratoria, enfermedad cardíaca y cualquier otra afección desvelada en el presente documento. Adicionalmente, en algunas realizaciones del método de la invención, se administra un segundo agente terapéutico.

30 En otra realización, la presente invención proporciona un compuesto para su uso en un método para inhibir sustancialmente la proliferación de una célula neoplásica que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del compuesto de la invención que inhibe la activación completa de Akt en una célula y un agente antineoplásico, en el que dicha inhibición de la proliferación celular se potencia a través del efecto sinérgico de dicho compuesto y dicho agente antineoplásico.

35 En algunas otras realizaciones, el agente antineoplásico utilizado en los métodos objeto de la invención, puede incluir, pero sin limitación, rapamicina, Gleevec, o derivados de los mismos, que inhiben una diana de rapamicina de mamíferos o Gleevec.

40 Usando una o más de las composiciones objeto de la invención, puede tratarse una gran variedad de afecciones neoplásicas. Dichas afecciones incluyen, pero sin limitación, afecciones neoplásicas, tales como reestenosis, cáncer seleccionado del linfoma de células B, linfoma de células T, carcinoma pulmonar no microcítico y leucemia, o un trastorno autoinmunitario.

45 El compuesto de la invención y/o el agente antineoplásico pueden administrarse por vía parenteral, oral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, intramuscular, liposomal, mediante suministro local por catéter o estent, por vía subcutánea, intraadiposa o intratecal.

## 50 Breve descripción de los dibujos

Las nuevas características de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos en los que:

60 La Figura 1A-1B resume los resultados de ensayos de inhibición de proliferación celular realizados con una amplia serie de líneas celulares neoplásicas *in vitro* usando fármacos antineoplásicos convencionales o el compuesto de la presente invención y compuestos relacionados de la Tabla 1. El procedimiento experimental se describe en el presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 17. En la Figura del presente documento, el grado de inhibición se describe como +, ++, +++, ++++ o +++++ en el orden de incremento de magnitud en cuanto a la inhibición de la proliferación celular. Los resultados demuestran que los compuestos de la Tabla 1 producen una inhibición del 50 % de la proliferación celular a una concentración que es un orden de magnitud, o dos, menor que el de los fármacos antineoplásicos convencionales cuando se ensayan en las mismas condiciones.

65 La Figura 2 es una inmunotransferencia de tipo western que ilustra el efecto dependiente de la dosis de un

compuesto de la Tabla 1 inhibiendo la fosforilación pAKT en el resto 47 así como de otras moléculas de señalización aguas abajo de mTOR incluyendo p4EBP1 y pRAS40. Los resultados demuestran que el inhibidor de mTOR objeto es más eficaz inhibiendo la fosforilación de Akt en comparación con rapamicina.

5 La Figura 3A representa el efecto *in vivo* de un compuesto de la Tabla 1 de la invención objeto inhibiendo el crecimiento tumoral en un modelo de tumor tal como el modelo de ratón de xenoinjerto de glioblastoma humano U87 durante un ciclo de aproximadamente 14 días de estudio tras la administración del compuesto a la dosis de 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0,3 mg/kg. La Figura 3B muestra los animales de ensayo y el tamaño del tumor extraído del animal de control negativo (tratado con PEG400) o de los animales de ensayo tratados con 0,3 mg/kg una vez al día, 1 mg/kg una vez al día o 3 mg/kg una vez cada dos días de un compuesto de la Tabla 1. La Figura 3C es una representación gráfica de peso corporal de los animales de ensayo y de control negativo medido durante el ciclo del tratamiento. Los resultados demuestran que el compuesto se tolera bien y no se detecta pérdida de peso significativa durante el periodo de tratamiento, y que el crecimiento tumoral se inhibe significativamente con la administración de uno o más compuestos de la presente invención en las condiciones ensayadas.

15 La Figura 4A ilustra un procedimiento experimental para evaluar la capacidad del compuesto de la invención para inhibir la señalización de mTOR, especialmente la fosforilación de AKT(473), PRAS40, S6(240) y 4EBP-1. El patrón de fosforilación de estas moléculas de señalización se muestra en la Figura 4B.

20 La Figura 5 representa los resultados de ensayos de selectividad de lípido quinasas y de proteína quinasas con un compuesto de la Tabla 1.

La Figura 6 representa los efectos de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención sobre la proliferación de células PC3, activación de pAKT en PC3 y proliferación de la línea celular tumoral primaria. Adicionalmente, la especificidad de un compuesto de la Tabla 1 se ensayó cultivando células Jurkat en sangre entera para ensayar la unión/inactivación inespecífica de uno o más compuestos por componentes de sangre entera.

25 La Figura 7A-7B representa el efecto de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención sobre la proliferación celular y la activación de la ruta PI3K en comparación con rapamicina. La Figura 7A representa un gráfico que muestra la curva de respuesta a la dosis de la proliferación de células PC3 en respuesta a rapamicina y a un compuesto de la invención de la Tabla 1. La Figura 7B representa un análisis de transferencia western de inhibición de la fosforilación de dianas de la ruta PI3K por uno o más compuestos seleccionados de la Tabla 1 en comparación con rapamicina.

30 La Figura 8A-8B representa una comparación del efecto de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención sobre la proliferación de las líneas celulares indicadas. La Figura 8A representa la  $CI_{50}$  del compuesto para la inhibición de líneas celulares derivadas de pulmón y colon y enumera las mutaciones de activación de proliferación respectivas asociadas con las de las líneas celulares. La Figura 8B representa los efectos de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención sobre la proliferación de líneas celulares que comprenden las diversas mutaciones de activación indicadas en comparación con la inhibición proporcionada por un inhibidor Pan PI3 quinasa o un inhibidor Pan PI3 quinasa que también inhibe mTOR.

35 La Figura 9A-9B representa los efectos de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención sobre la progresión del ciclo celular en células HCT116 y SW620 en comparación con diversos otros compuestos. La Figura 9A representa el efecto de inhibición del compuesto a 500 nM sobre la progresión del ciclo celular en comparación con control vehículo DMSO y en comparación con doxorubicina 10  $\mu$ M. La Figura 9B representa el efecto de los compuestos indicados sobre la población de células que residen en el cultivo durante la fase  $G_0/G_1$  para dos líneas celulares diferentes.

45 La Figura 10 representa un análisis de inmunotransferencia tipo western del efecto del compuesto de la presente invención sobre la fosforilación en células tumorales de un modelo de ratón de tumor de xenoinjerto U87-MG.

Las Figuras 11A-11D representan la eficacia de la administración oral del compuesto de la presente invención para inhibir el crecimiento de tumores de xenoinjerto U87-MG, A549, ZR-75-1 y 786-O en ratones desnudos atímicos hembra.

55 La Figura 12 representa los resultados de la tinción TUNEL de la masa tumoral de tumores de xenoinjerto U87-MG extraídos de ratones, a los que se les administró vehículo, 1 mg/kg, o 3 mg/kg del compuesto de la invención, por vía oral. Estos resultados muestran apoptosis aumentada *in vivo* en presencia de un compuesto de la Tabla 1 de la presente invención. La Figura 12 representa adicionalmente el tamaño de los tumores U87 extraídos que disminuye con una dosis en aumento de un compuesto de la presente invención.

#### Descripción detallada de la invención

65 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que normalmente entiende un experto en la técnica a la cual pertenece la

presente invención.

Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un/o", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

5 La expresión "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación que se pretende realizar, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de la enfermedad, como se define más adelante. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la aplicación que se pretende realizar (*in vitro* o *in vivo*), o del sujeto y de la  
10 patología que vaya a tratarse, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la patología, la manera de administración y similar, que puede determinarla fácilmente un experto habitual en la técnica. La expresión también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en células diana, por ejemplo, reducción de la adhesión plaquetaria y/o migración celular. La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares seleccionados, del régimen de dosificación a seguir, de si se administra en combinación con otros compuestos, del  
15 tiempo de administración, del tejido al cual se administra y del sistema de suministro físico en el que se realiza.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento" o "tratar", o "paliar" o "mejorar" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos se refieren a una estrategia para obtener resultados  
20 beneficiosos o deseados incluyendo, pero sin limitación, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que vaya a tratarse. Además, se consigue un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente, de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, pese a que el sujeto aún padezca el trastorno subyacente. Para un beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un sujeto que esté en riesgo de desarrollar una enfermedad particular o a un sujeto que refiere uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad.  
25

Un "efecto terapéutico", tal como se usa el término en el presente documento, incluye un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico como se ha descrito anteriormente. Un efecto profiláctico incluye el retraso o la eliminación de la aparición de una enfermedad o afección, el retraso o la eliminación de la aparición de los síntomas de una enfermedad o afección, la disminución, detención o inversión de la progresión de una enfermedad o afección, o cualquiera de sus combinaciones.  
30

El término "co-administración", "administrado en combinación con" y sus equivalentes gramaticales, como se usan en el presente documento, incluyen la administración de dos o más agentes a un animal de tal manera que ambos agentes y/o sus metabolitos están presentes en el sujeto al mismo tiempo. La co-administración incluye la administración simultánea en composiciones distintas, la administración a diferentes tiempos en composiciones distintas, o la administración en una composición en la que ambos agentes están presentes.  
35

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales procedentes de diversos contraiones orgánicos e inorgánicos muy conocidos en la técnica e incluyendo, solo como ejemplos, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, tetraalquilamonio y similares, cuando la molécula contiene una funcionalidad ácida; y cuando la molécula contiene una funcionalidad básica, sales de ácidos orgánicos o inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, tartrato, mesilato (metanosulfonato), etanosulfonato, acetato, oxalato, fosfato, y similares. En un compuesto con más de un resto básico, más de uno de los restos básicos puede transformarse a la forma salina, incluyendo, pero sin limitación, una sal bis o tris. Como alternativa, un compuesto que tiene más de un resto básico puede formar una sal solo en uno de los restos básicos.  
40  
45

Los términos "antagonista" e "inhibidor" se usan indistintamente, y se refieren a un compuesto que tiene la capacidad de inhibir una función biológica de una proteína diana, ya sea inhibiendo la actividad o la expresión de la proteína diana. Por consiguiente, los términos "antagonista" e "inhibidores" se definen en el contexto del papel biológico de la proteína diana. Aunque en el presente documento los antagonistas preferidos interaccionan específicamente con la diana (por ejemplo, se unen a ella), los compuestos que inhiben una actividad biológica de la proteína diana por interacción con otros miembros de la ruta de transducción de señales de la cual es un miembro la proteína diana, también se incluyen específicamente en esta definición. Una actividad biológica preferida inhibida por un antagonista está asociada con el desarrollo, el crecimiento o la propagación de un tumor.  
50  
55

El término "agonista" como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que tiene la capacidad de iniciar o potenciar una función biológica de una proteína diana, ya sea inhibiendo la actividad o la expresión de la proteína diana. Por consiguiente, el término "agonista" se define en el contexto del papel biológico del polipéptido diana. Aunque en el presente documento los agonistas preferidos interaccionan específicamente con la diana (por ejemplo, se unen a ella), los compuestos que inician o potencian una actividad biológica del polipéptido diana interaccionando con otros miembros de la ruta de transducción de señales de la cual es un miembro el polipéptido diana, también se incluyen específicamente en esta definición.  
60

65 Como se usa en el presente documento, "agente" o "agente biológicamente activo" se refiere a un compuesto biológico, farmacéutico o químico o a otro resto. Como ejemplos no limitantes se incluyen una molécula orgánica o

inorgánica simple o compleja, un péptido, una proteína, un oligonucleótido, un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un derivado de vitamina, un carbohidrato, una toxina o un compuesto quimioterapéutico. Diversos compuestos pueden sintetizarse, por ejemplo, moléculas pequeñas y oligómeros (por ejemplo, oligopéptidos y oligonucleótidos) y compuestos orgánicos sintéticos basados en diversas estructuras núcleo.

5 Además, diversas fuentes naturales pueden proporcionar compuestos para la exploración, tales como extractos vegetales o animales y similares.

La "transducción de señal" es un proceso durante el cual se transmiten señales estimuladoras o inhibitoras hacia el interior y dentro de una célula para suscitar una respuesta intracelular. Un modulador de una ruta de transducción de señal se refiere a un compuesto que modula la actividad de una o más proteínas celulares identificadas en la misma ruta de transducción de señal específica. Un modulador puede aumentar (agonista) o suprimir (antagonista) la actividad de una molécula de señalización.

10

Un "agente antineoplásico", "agente antitumoral" o "agente quimioterapéutico" se refiere a cualquier agente útil en el tratamiento de una afección neoplásica. Una clase de agentes antineoplásicos comprende agentes quimioterapéuticos. La "quimioterapia" significa la administración de uno o más fármacos quimioterapéuticos y/u otros agentes a un paciente con cáncer mediante diversos métodos, incluyendo la administración intravenosa, oral, intramuscular, intraperitoneal, intravesical, subcutánea, transdérmica, bucal, o por inhalación o en forma de un supositorio.

15

La expresión "proliferación celular" se refiere a un fenómeno mediante el cual el número de células ha cambiado como resultado de la división. Este término también incluye crecimiento celular mediante el cual la morfología celular ha cambiado (por ejemplo, ha aumentado de tamaño) en consonancia con una señal proliferativa.

20

La expresión "inhibición selectiva" o "inhibe selectivamente" se refiere a un agente biológicamente activo que se refiere a la capacidad del agente para reducir preferencialmente la actividad de señalización diana en comparación con la actividad de señalización inespecífica, mediante la interacción directa o indirecta con la diana.

25

"Actividad de mTorC1 y/o mTorC2" como se aplica a un agente biológicamente activo se refiere a la capacidad del agente para modular la transducción de señal mediada por mTorC1 y/o mTorC2. Por ejemplo, la modulación de mTorC1 y/o la actividad de mTorC2 se pone de manifiesto por la alteración del resultado de la señalización de la ruta PI3K/Akt/mTor.

30

El término "B-ALL", como se usa en el presente documento, se refiere a Leucemia Linfoblástica Aguda de linfocitos B.

35

"Sujeto" se refiere a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en aplicaciones tanto terapéuticas humanas como veterinarias. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero, y en algunas realizaciones el sujeto es un ser humano.

40

"Radioterapia" significa exponer a un sujeto, usando métodos habituales y composiciones conocidas por el médico, a emisores de radiación, tales como radionúclidos emisores de partículas alfa (por ejemplo, radionúclidos de actinio y torio), a emisores de radiación de transferencia lineal de energía (LET, *Linear Energy Transfer*) baja (es decir, emisores beta), a emisores de conversión de electrones (por ejemplo estroncio-89 y samario-153-EDTMP), o a radiación de alta energía, incluyendo, sin limitación rayos x, rayos gamma y neutrones.

45

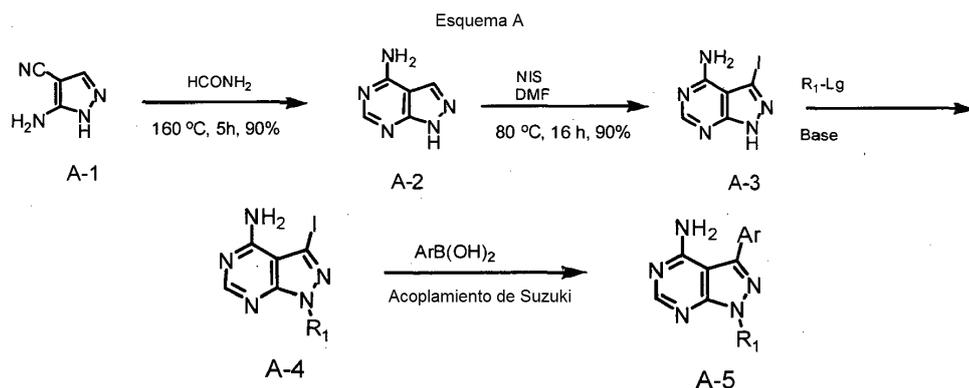
Un "agente antineoplásico", "agente antitumoral" o "agente quimioterapéutico" se refiere a cualquier agente útil en el tratamiento de una afección neoplásica. Una clase de agentes antineoplásicos comprende agentes quimioterapéuticos. "Quimioterapia" significa la administración de uno o más fármacos quimioterapéuticos y/u otros agentes a un paciente con cáncer mediante diversos métodos, incluyendo administración intravenosa, oral, intramuscular, intraperitoneal, intravesical, subcutánea, transdérmica, bucal, o inhalación o en forma de un supositorio.

50

## B. ESQUEMAS DE REACCIÓN

55

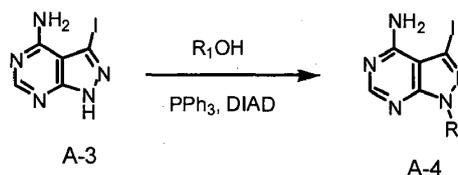
Los compuestos de la invención pueden prepararse por las rutas que se describen a continuación. Los materiales usados en el presente documento están disponibles en el mercado o pueden prepararse mediante métodos sintéticos conocidos generalmente en la técnica.



En una realización, los compuestos se sintetizan condensando un heterociclo funcionalizado A-1 con formamida, para proporcionar una pirazolopirimidina A-2. La pirazolopirimidina se trata con N-yodosuccinimida, que introduce un sustituyente de yodo en el anillo pirazol como en A-3. El sustituyente R<sub>1</sub> se introduce haciendo reaccionar la pirazolopirimidina A3 con un compuesto de Fórmula R<sub>1</sub>-Lg en presencia de una base tal como carbonato potásico para producir un compuesto de Fórmula de Fórmula A-4. Otras bases que son adecuadas para su uso en esta etapa incluyen, pero sin limitación, hidruro sódico y t-butóxido potásico. El compuesto de Fórmula R<sub>1</sub>-Lg tiene un resto R<sub>1</sub> como se define para R<sub>1</sub> de un compuesto de Fórmula I'-A', como se ha expuesto anteriormente, y en la que -Lg es un grupo saliente apropiado tal como haluro (incluyendo bromo, yodo y cloro), tosilato, u otro grupo saliente adecuado.

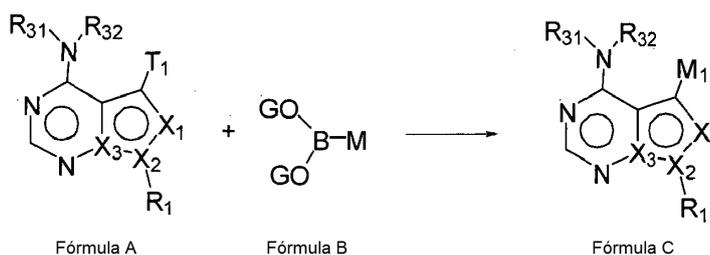
Por lo tanto, los sustituyentes correspondientes a M<sub>1</sub> se introducen haciendo reaccionar ácidos aril o heteroaril borónicos con el compuesto de Fórmula A-4 para obtener el compuesto A-5.

Esquema A-1



Como alternativa, puede usarse una química de Mitsunobu para obtener pirazolopirimidina alquilada A-4, como se muestra en el Esquema A-1. Se hace reaccionar yodopirazolopirimidina A-3 con un alcohol adecuado, en presencia de trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo (DIAD) para producir la pirazolopirimidina A-4.

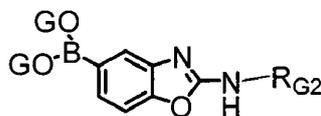
Esquema B



Los compuestos de la invención pueden sintetizarse a través de un esquema de reacción representado generalmente en el Esquema B. La síntesis avanza a través del acoplamiento de un compuesto de Fórmula A con un compuesto de Fórmula B para producir un compuesto de Fórmula C. La etapa de acoplamiento se cataliza típicamente usando, por ejemplo, un catalizador de paladio, incluyendo, pero sin limitación, *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio. El acoplamiento se realiza generalmente en presencia de una base adecuada, siendo un ejemplo no limitante carbonato sódico. Un ejemplo de un disolvente adecuado para la reacción es dioxano acuoso.

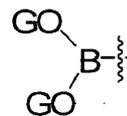
Un compuesto de Fórmula A para su uso en el Esquema B tiene una estructura de Fórmula A, en la que T<sub>1</sub> es triflato o halo (incluyendo bromo, cloro y yodo), y en la que R<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, R<sub>31</sub> y R<sub>32</sub> se definen como para un compuesto de Fórmula I'-A'. Para los ácidos borónico y derivados de ácido como se representa en la Fórmula B, M es M<sub>1</sub> o M<sub>2</sub>. M<sub>1</sub> se define como para un compuesto de Fórmula I'-A'. Por ejemplo, M<sub>1</sub> puede ser un resto 5-benzoxazolilo o un resto 6-benzoxazolilo, incluyendo, pero sin limitación, los restos M<sub>1</sub> desvelados en el presente documento. M<sub>2</sub> es un resto que se transforma sintéticamente para formar M<sub>1</sub>, después de que el resto M<sub>2</sub> se ha acoplado al núcleo bicíclico del compuesto de Fórmula A.

Para un compuesto de Fórmula B, G es hidrógeno o  $R_{G1}$ , en la que  $R_{G1}$  es alquilo, alqueniilo o arilo. Como alternativa,  $B(OG)_2$  se toma en conjunto para formar un resto cíclico de 5 o 6 miembros. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula B es un compuesto que tiene una estructura de Fórmula E:



Fórmula E

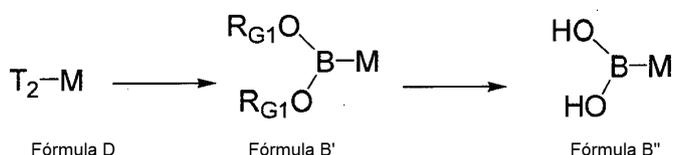
5



en la que G es H o  $R_{G1}$ ;  $R_{G1}$  es alquilo, alqueniilo o arilo. Como alternativa, forma un resto cíclico de 5 o 6 miembros; y  $R_2$  es un resto  $R_{G2}$ , en la que el resto  $R_{G2}$  es H, acilo, o un grupo protector amino incluyendo, pero sin limitación, carbamato de terc-butilo (Boc), carbobenciloxi (Cbz), bencilo (Bz), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), p-metoxibencilo (PMB) y similares.

10

Esquema C



En algunas realizaciones, un compuesto de Fórmula B es un compuesto de Fórmula B', en la que G es  $R_{G1}$ , o un compuesto de Fórmula B'', en la que G es hidrógeno. El Esquema C representa un esquema ejemplar para sintetizar un compuesto de Fórmula B' u, opcionalmente, Fórmula B'' para su uso en el Esquema de Reacción C. Esta reacción avanza a través de la reacción de un compuesto de Fórmula D con un borato de trialquilo o un derivado de ácido borónico para producir un compuesto de Fórmula B'. La reacción se realiza típicamente en un disolvente tal como dioxano o tetrahidrofurano. El borato de trialquilo incluye, pero sin limitación, borato de triisopropilo, y el derivado de ácido borónico incluye, pero sin limitación, bis(pinacolato)diboro.

15

20

Cuando la reacción se realiza con borato de trialquilo, se añade en primer lugar una base tal como n-butil litio al compuesto de Fórmula D para generar un anión, antes de la adición del borato. Cuando la reacción se realiza con un derivado de ácido borónico tal como bis(pinacolato)diboro, se usa un catalizador de paladio y una base. Los catalizadores de paladio típicos incluyen, pero sin limitación, cloruro de paladio(difenilfosfina)ferroceno). Una base adecuada incluye, pero sin limitación, acetato potásico.

25

Un compuesto de Fórmula D para su uso en el Esquema C es un compuesto en el que  $T_2$  es halo u otro grupo saliente y M es como se ha definido anteriormente en el Esquema B. El compuesto de Fórmula B' puede convertirse adicionalmente en un compuesto de Fórmula B'' por tratamiento con un ácido tal como ácido clorhídrico.

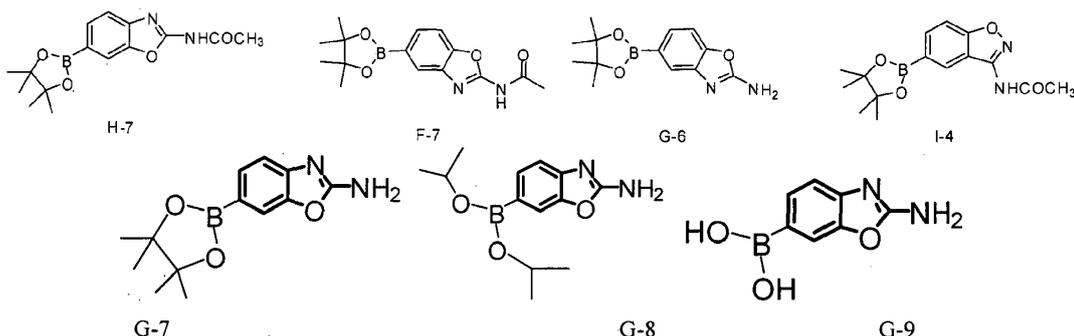
30

En una realización de un compuesto de Fórmula B, B', B'' o E, los grupos G son hidrógeno. En otro de un compuesto de Fórmula B, B', B'' o E, los grupos G son  $R_{G1}$ .

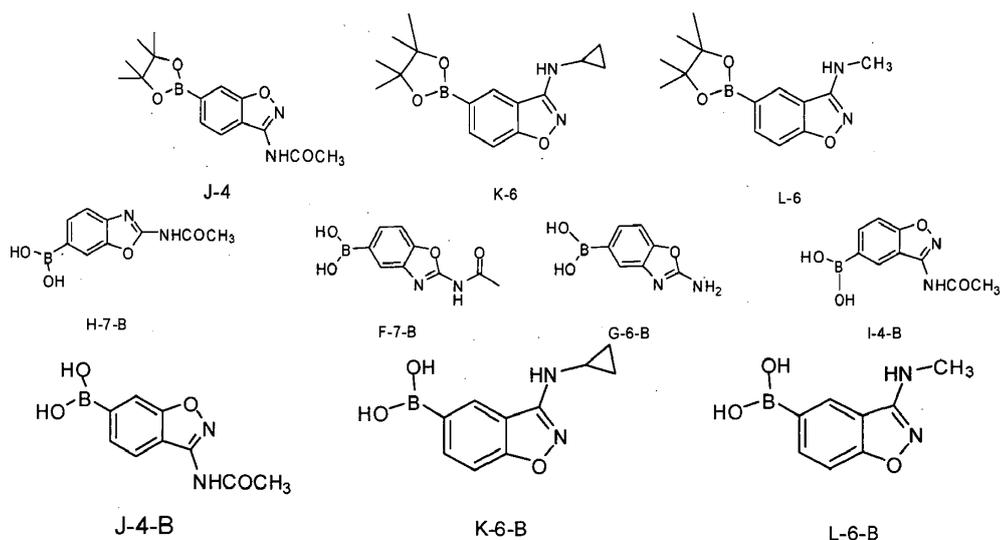
En algunas realizaciones, no se realiza ninguna transformación sintética adicional del resto  $M_1$  después de la reacción de acoplamiento cuando, por ejemplo  $M_1$  es 2-N-acetil-benzoxazol-5-ilo.

35

Algunos compuestos ejemplares de Fórmula B que pueden sintetizarse a través del Esquema C incluyen, pero sin limitación, compuestos de las siguientes fórmulas:

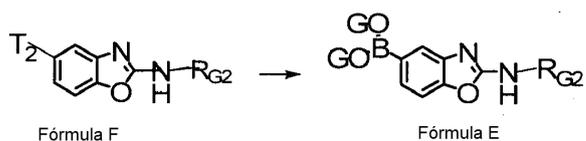


40



5 En otras realizaciones de la invención, un compuesto de Fórmula E se sintetiza a partir de un compuesto de Fórmula F, como se muestra en el Esquema C-1:

Esquema C-1



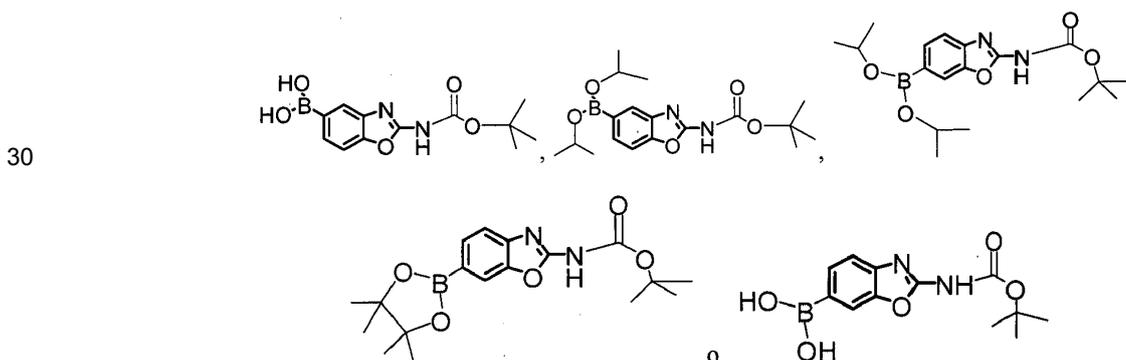
10 El Esquema C-1 representa un esquema ejemplar para sintetizar un compuesto de Fórmula E. Esta reacción avanza a través de la reacción de un compuesto de Fórmula F con un borato de trialquilo o un derivado de ácido borónico para producir un compuesto de Fórmula E. Las condiciones de la reacción son como se ha descrito anteriormente en el Esquema C.

15 Un compuesto de Fórmula F para su uso en el Esquema C-1, es un compuesto en el que  $T_2$  es halo (incluyendo Br, Cl e I) u otro grupo saliente (incluyendo, pero sin limitación, triflato, tosilato y mesilato), y el resto  $G_p$  es H, acilo, o un grupo protector amino que incluye, pero sin limitación, carbamato de terc-butilo (Boc), carbobenciloxi (Cbz), bencilo (Bz), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), p-metoxibencilo (PMB) y similares.

20 El compuesto de Fórmula E, en la que G es alquilo, puede convertirse adicionalmente en un compuesto de Fórmula E, en la que G es hidrógeno, por tratamiento con un ácido tal como ácido clorhídrico.

25 Cuando se desee, se realiza la desprotección de un sustituyente (por ejemplo, eliminación de la protección Boc de un sustituyente amino) en el resto benzoxazolilo (es decir  $M_1$  de Fórmula C) después del acoplamiento del compuesto de Fórmula B al compuesto de Fórmula A.

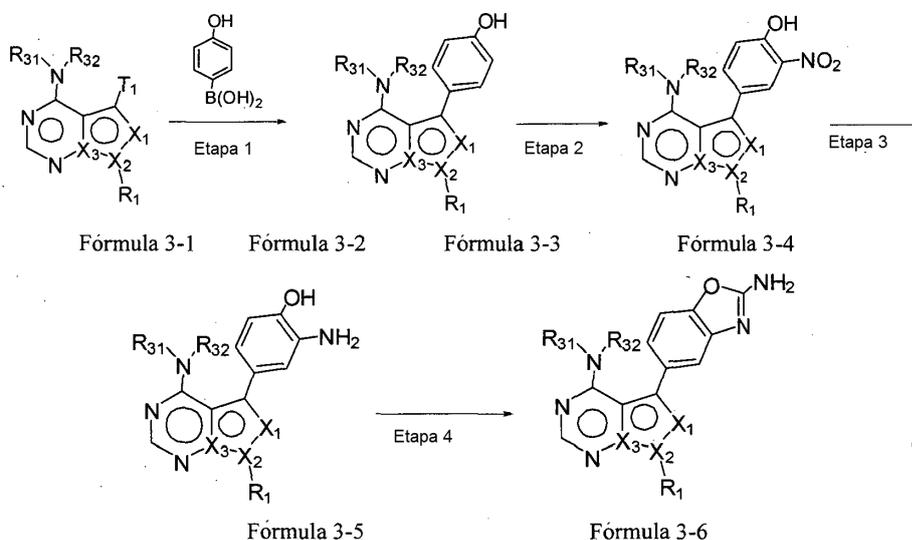
Algunos compuestos ejemplares con dichos grupos protectores, incluyen, pero sin limitación, compuestos de las siguientes fórmulas:



Una transformación ejemplar de  $M_2$  en  $M_1$  puede realizarse a través del Esquema D como se muestra a

continuación.

Esquema D

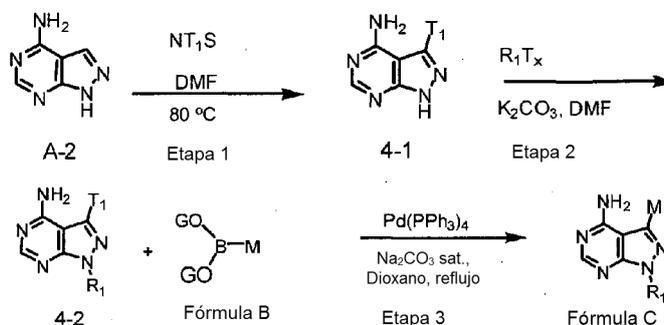


- 5 En la Etapa 1, un compuesto de Fórmula 3-1 se hace reaccionar con ácido borónico 3-2, en presencia de *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio y una base adecuada, tal como carbonato sódico en una mezcla de disolvente acuoso/orgánico, para producir un compuesto de Fórmula 3-3. En la Etapa 2, el compuesto de Fórmula 3-3 se hace reaccionar con aproximadamente 2 equivalentes de ácido nítrico en ácido acético como disolvente para producir un compuesto de Fórmula 3-4. Pueden usarse dos transformaciones alternativas para realizar la siguiente
- 10 transformación de la Etapa 3. En el primer método, el compuesto de Fórmula 3-4 se trata con ditionito sódico e hidróxido sódico en agua para producir un compuesto de Fórmula 3-5. Como alternativa, el compuesto de Fórmula 3-4 se reduce usando paladio sobre carbono en un disolvente adecuado en una atmósfera de hidrógeno para producir un compuesto de Fórmula 3-5.
- 15 En la Etapa 4, el compuesto 3-5 se hace reaccionar con aproximadamente 1,2 equivalentes de bromuro cianógeno en un disolvente tal como una mezcla metanol/tetrahidrofurano para producir un compuesto de Fórmula 3-6. El compuesto de Fórmula 3-6 puede transformarse adicionalmente por otra sustitución o derivación.

20 Un compuesto de Fórmula 3-1 útil en el método del Esquema D es un compuesto que tiene una estructura de Fórmula 3-1, en la que T<sub>1</sub> es triflato o halo (incluyendo bromo, cloro y yodo), y en la que R<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, R<sub>31</sub> y R<sub>32</sub> se definen como para un compuesto de Fórmula I'-A'.

Los compuestos ejemplares que tienen un núcleo de pirazolopirimidina pueden sintetizarse a través del Esquema E.

Esquema E

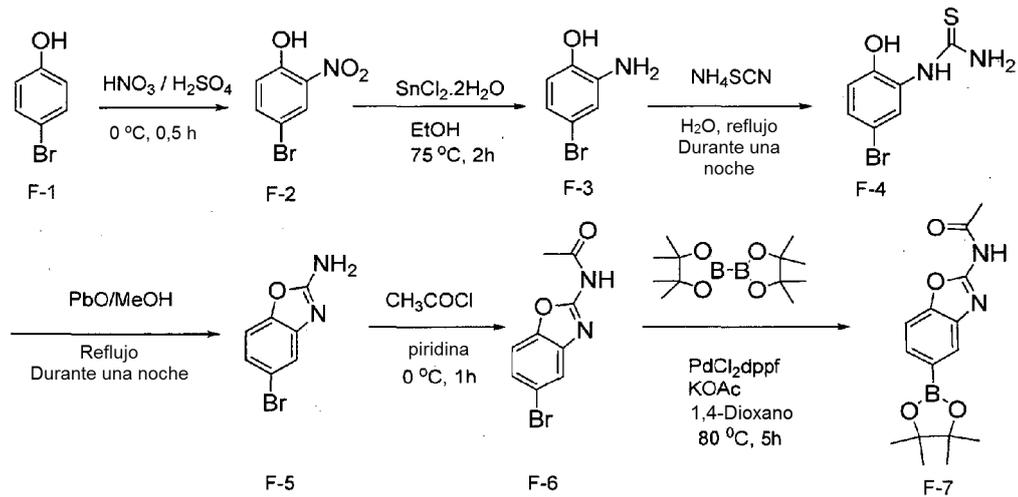


- 25 En la Etapa 1 del Esquema E, el compuesto A-2 en dimetilformamida (DMF), se hace reaccionar con una N-halosuccinimida (NT<sub>1</sub>S) a aproximadamente 80 °C, para proporcionar el compuesto 4-1, donde T<sub>1</sub> es yodo o bromo. En la Etapa 2, el compuesto 4-1 en DMF se hace reaccionar con un compuesto R<sub>1</sub>T<sub>x</sub>, en presencia de carbonato potásico, para proporcionar el compuesto 4-2. En la Etapa 4, el compuesto 4-2 se acopla con un compuesto de
- 30 Fórmula B usando catálisis de paladio tal como *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio y en presencia de carbonato sódico, para producir un compuesto de pirazolopirimidina como se muestra.

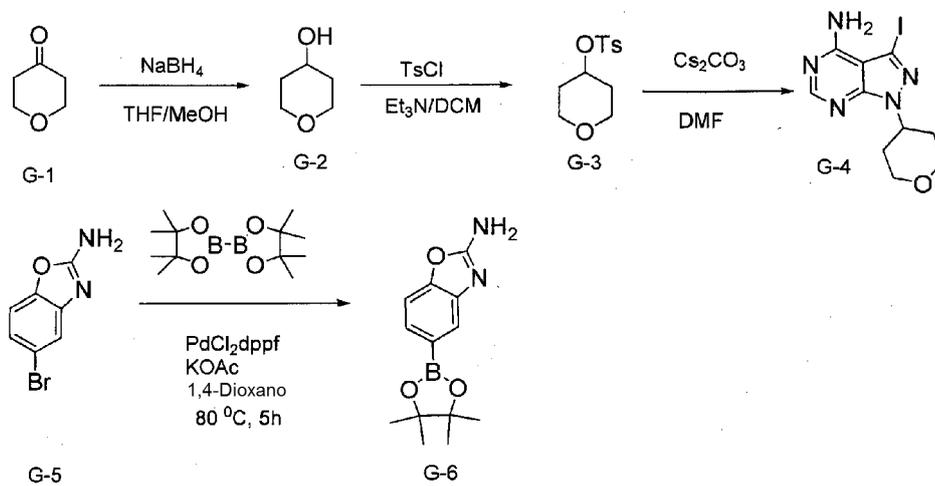
Un compuesto de Fórmula R<sub>1</sub>T<sub>x</sub> adecuado para su uso en el Esquema de Reacción E es el compuesto en el que R<sub>1</sub> es cicloalquilo o alquilo y T<sub>x</sub> es halo (incluyendo bromo, yodo o cloro) o un grupo saliente, incluyendo, pero sin limitación, mesilato o tosilato.

- 5 Los Esquemas de Reacción F-M ilustran métodos de síntesis de reactivos de borano útiles en la preparación de intermedios de uso en la síntesis de los compuestos de la invención como se ha descrito en los Esquemas de Reacción A, B y E anteriores, para introducir sustituyentes M<sub>1</sub>.

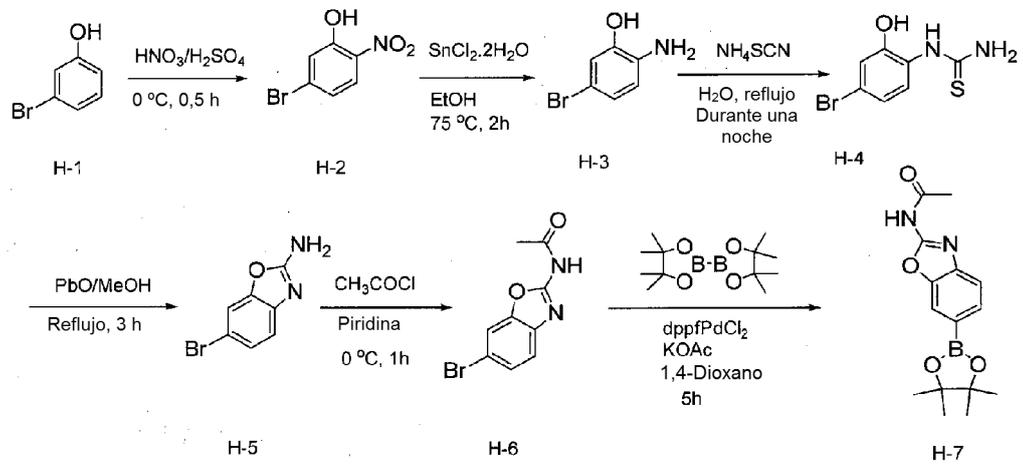
Esquema de reacción F



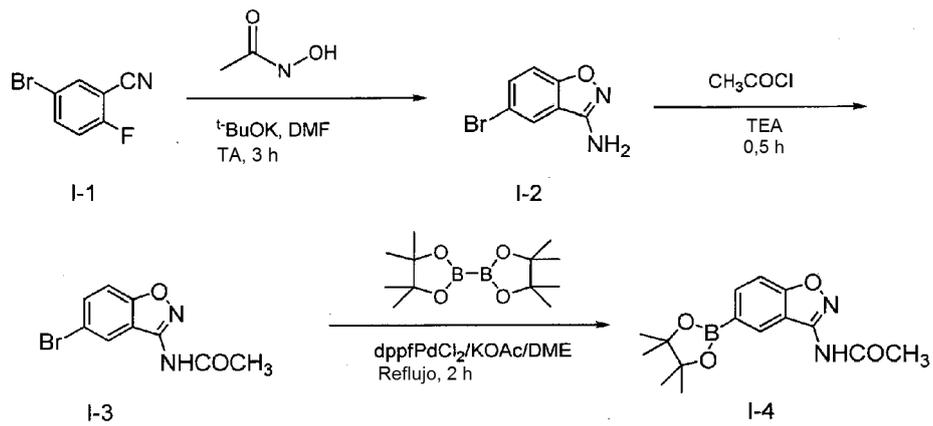
Esquema de reacción G



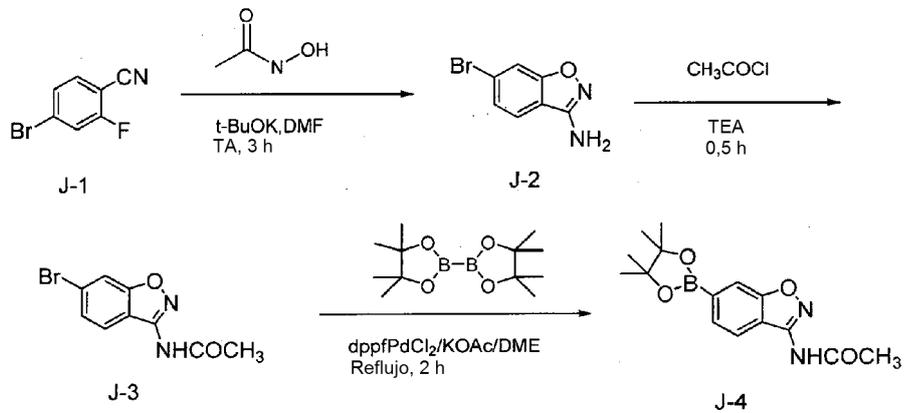
Esquema de reacción H



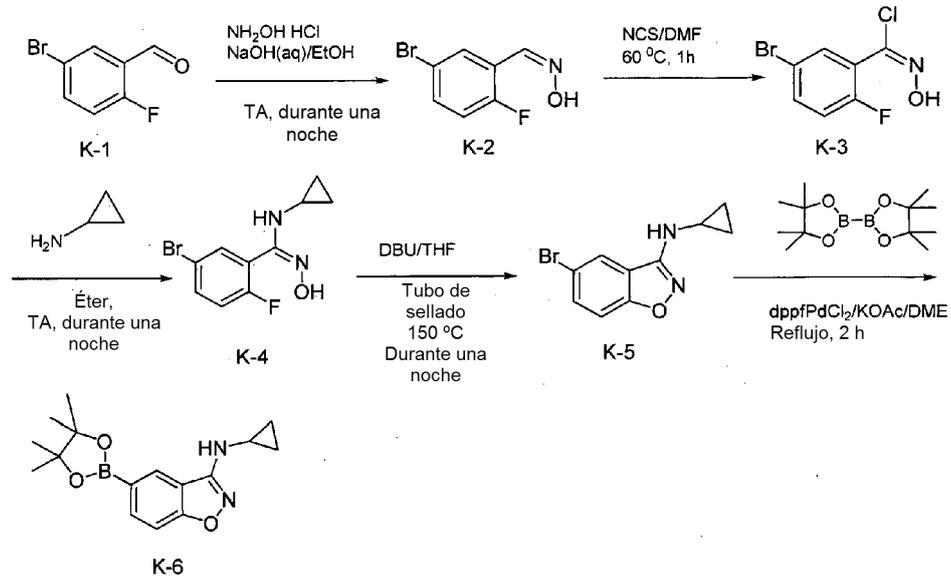
Esquema de reacción I



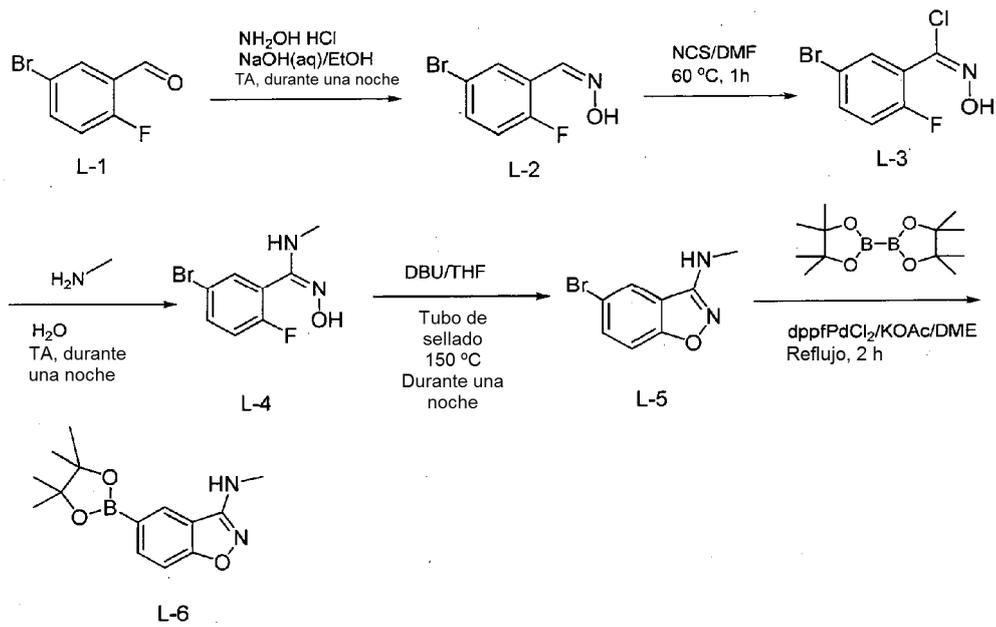
Esquema de reacción J



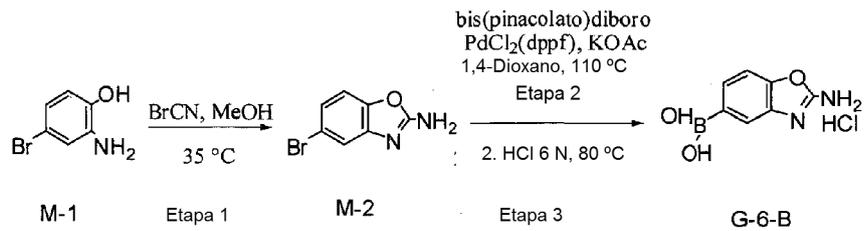
Esquema de reacción K



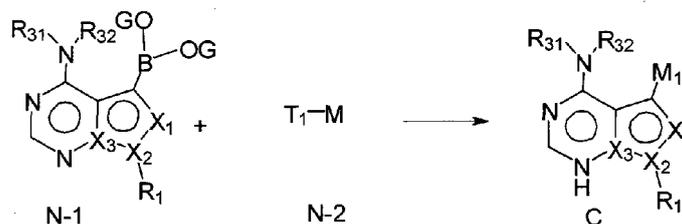
Esquema de reacción L



Esquema de reacción M



Esquema de reacción N

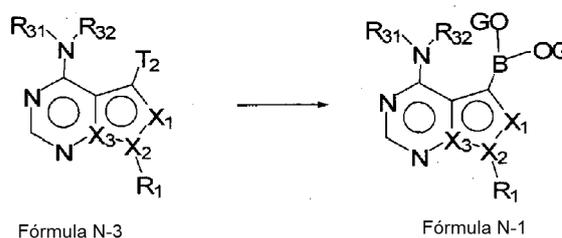


5 En un método alternativo de síntesis, un compuesto de Fórmula N-1 y un compuesto de N-2 se acoplan para producir un compuesto de Fórmula C. La etapa de acoplamiento se cataliza típicamente usando, por ejemplo, un catalizador de paladio, incluyendo, pero sin limitación, *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio. El acoplamiento se realiza generalmente en presencia de una base adecuada, siendo un ejemplo no limitante carbonato sódico. Un ejemplo de un disolvente adecuado para la reacción es dioxano acuoso.

10 Un compuesto de Fórmula N-1 para su uso en el Esquema N tiene una estructura de Fórmula N-1, en la que G es hidrógeno o  $R_{G1}$ , en la que  $R_{G1}$  es alquilo, alqueno o arilo. Como alternativa,  $B(OG)_2$  del compuesto de Fórmula N-1 se toma en conjunto para formar un resto cíclico de 5 o 6 miembros.  $R_1$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $R_{31}$  y  $R_{32}$  del compuesto de Fórmula N-1 se definen según un compuesto de Fórmula I'-A'.

15 Un compuesto de Fórmula N-2 para su uso en el Esquema N tiene una estructura de Fórmula N-2 en la que  $T_1$  es triflato o halo (incluyendo bromo, cloro y yodo). M del compuesto de Fórmula N-2 es  $M_1$  o  $M_2$ .  $M_1$  se define según un compuesto de Fórmula I. Por ejemplo,  $M_1$  puede ser un resto 5-benzoxazolilo o un resto 6-benzoxazolilo, incluyendo, pero sin limitación, los restos  $M_1$  desvelados en el presente documento.  $M_2$  es un resto que se transforma sintéticamente para formar  $M_1$ , después de que el resto  $M_2$  se haya acoplado al núcleo bicíclico del compuesto de Fórmula N-1.

Esquema N-1



20 Un compuesto de Fórmula N-1 puede sintetizarse como se muestra en el Esquema N-1. Un compuesto de Fórmula N-1 se hace reaccionar con un borato de trialquilo o un derivado de ácido borónico para producir un compuesto de Fórmula N-1. La reacción se realiza típicamente en un disolvente tal como dioxano o tetrahidrofurano. El borato de trialquilo incluye, pero sin limitación, borato de triisopropilo y el derivado de ácido borónico incluye, pero sin limitación, bis(pinacolato)diboro.

25

30 Cuando la reacción se realiza con borato de trialquilo, se añade en primer lugar una base tal como n-butil litio al compuesto de Fórmula N-3 para generar un anión, antes de la adición del borato. Cuando la reacción se realiza con un derivado de ácido borónico tal como bis(pinacolato)diboro, se usa un catalizador de paladio y una base. Los catalizadores de paladio típicos incluyen, pero sin limitación, cloruro de (difenilfosfina)ferroceno paladio. Una base adecuada incluye, pero sin limitación, acetato potásico.

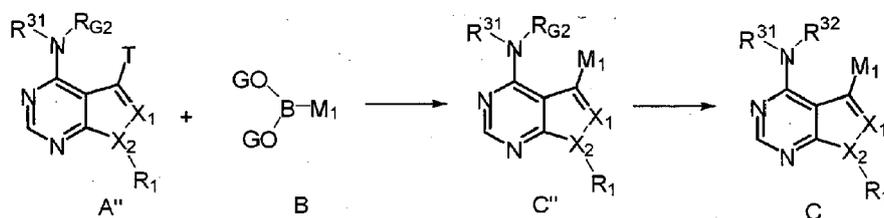
35 Un compuesto de Fórmula N-3 adecuado para su uso en el Esquema N-1 es un compuesto en el que  $T_2$  es halo u otro grupo saliente, tal como mesilato, tosilato o triflato.  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $R_1$ ,  $R_{31}$  y  $R_{32}$  del compuesto de Fórmula N-3 es como se definen según compuesto de Fórmula I'-A'.

40 En algunas realizaciones de la invención, un compuesto de Fórmula A, B, B', B'', C, C'', D, E, E'', 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1'', N-3'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', N-1'' o N-3'' se proporciona en forma de su sal, incluyendo, pero sin limitación, clorhidrato, acetato, formiato, nitrato, sulfato y boronato.

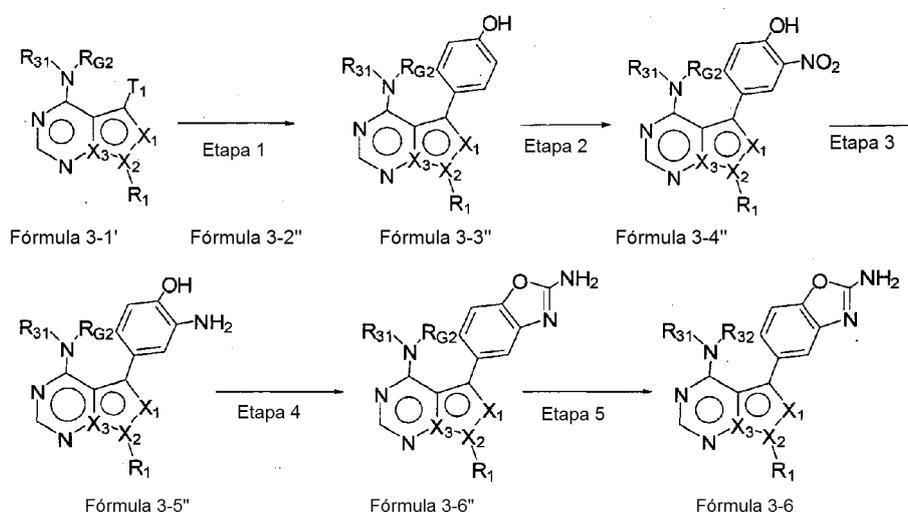
45 En algunas realizaciones de la invención, se usa un compuesto de paladio, que incluye, pero sin limitación, cloruro de (difenilfosfina)ferroceno paladio y *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio, en la síntesis de un compuesto de Fórmula A, B, B', B'', C, C'', D, E, E'', 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1'', N-3'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', N-1'' o N-3'', está presente en una cantidad que varía de

- aproximadamente 0,005 equivalentes molares a aproximadamente 0,5 equivalentes molares, de aproximadamente 0,05 equivalentes molares a aproximadamente 0,20 equivalentes molares, de aproximadamente 0,05 equivalentes molares a aproximadamente 0,25 equivalentes molares, de aproximadamente 0,07 equivalentes molares a aproximadamente 0,15 equivalentes molares, o de aproximadamente 0,8 equivalentes molares a aproximadamente 0,1 equivalentes molares del compuesto de Fórmula A, B, B', B'', C, D, E, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1, o N-3. En algunas realizaciones, está presente un compuesto de paladio, incluyendo, pero sin limitación, cloruro de (difenílfosfino)ferroceno) paladio y *tetraquis*(trifenilfosfina)paladio en la síntesis de un compuesto de Fórmula A, B, B', B'', C, C'', D, E, E'', 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1'', N-3'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', N-1'' o N-3'' en aproximadamente 0,07, aproximadamente 0,08, aproximadamente 0,09, aproximadamente 0,10, aproximadamente 0,11, aproximadamente 0,12, aproximadamente 0,13, aproximadamente 0,14, o aproximadamente 0,15 equivalentes molares de un material de partida de Fórmula A, B, B', B'', C, C'', D, E, E'', 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1'', N-3'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', N-1'', o N-3'' que se usa para sintetizar un compuesto de Fórmula A, B, B', B'', C, C'', D, E, E'', 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1'', N-3'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', N-1'' o N-3''.
- En algunas realizaciones de los esquemas de reacción anteriores B, D, E, N o N-1, otra realización de los compuestos de Fórmula A, C, 3-1, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, A-2, 4-1, 4-2, N-1 y N-3 es como se muestra en los Esquemas B'. D'. E'. N' o N-1' a continuación. En estas síntesis alternativas, la producción de un compuesto de Fórmula C, 3-1, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, A-2, 4-1, 4-2, N-1 o N-3, usa compuestos que comprenden un resto amino que tiene un resto R<sub>G2</sub> presente durante una o más de las etapas sintéticas, en el que R<sub>G2</sub> es un grupo protector amino que incluye, pero sin limitación, carbamato de terc-butilo (Boc), carbobenciloxi (Cbz), bencilo (Bz), fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), p-metoxibencilo (PMB) y similares. Estos compuestos incluyen un compuesto de Fórmula A'', C'', 3-1'', 3-3'', 3-4'', 3-5'', 3-6'', A-2'', 4-1'', 4-2'', N-1'' o N-3''.
- El resto R<sub>G2</sub> se retira, usando métodos adecuados, en cualquier punto deseado, después de lo cual el compuesto de Fórmula C, 3-1, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, A-2, 4-1, 4-2, N-1 o N-3 tiene un R<sub>31</sub> hidrógeno que reemplaza el resto R<sub>G2</sub> en el resto amino. Esta transformación se ilustra específicamente para la conversión de un compuesto de Fórmula C'' en un compuesto de C (es decir, como en la Etapa 4 del Esquema E') y para la conversión de un compuesto de Fórmula 3-6'' en un compuesto de Fórmula 3-6 (es decir, como en la Etapa 5 del Esquema D'). Esta ilustración no es limitante de ningún modo para la elección de las etapas en las que un compuesto que comprende un resto NR<sub>31</sub>R<sub>G2</sub> puede convertirse en un compuesto que comprende un resto NR<sub>31</sub>R<sub>32</sub> en el que el resto R<sub>32</sub> es hidrógeno.

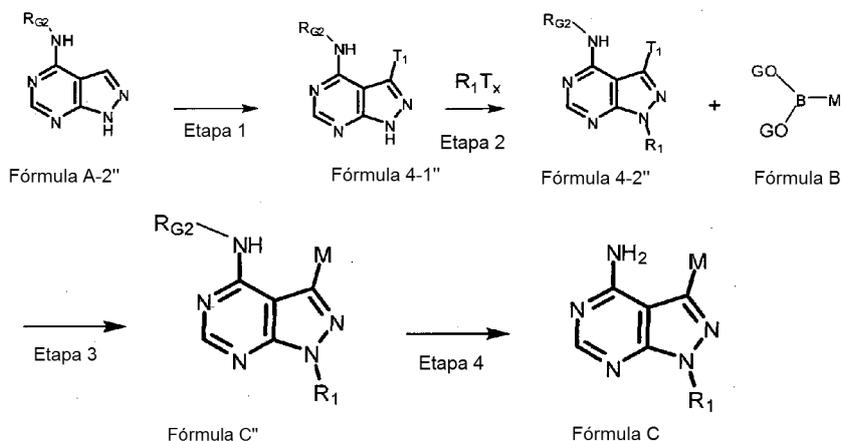
Esquema B'



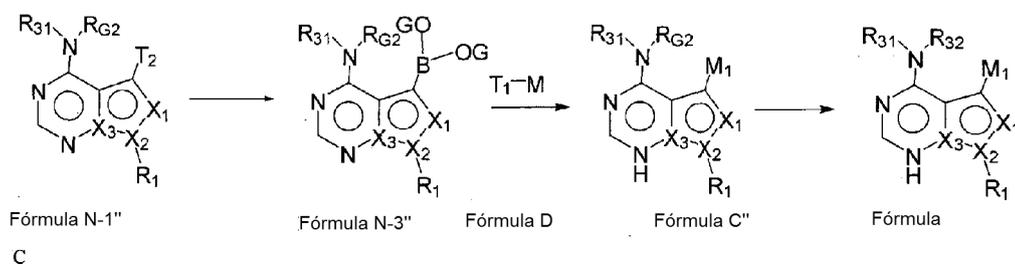
Esquema D'



Esquema E'



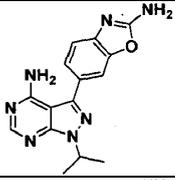
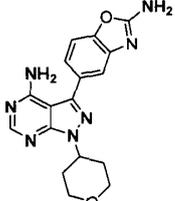
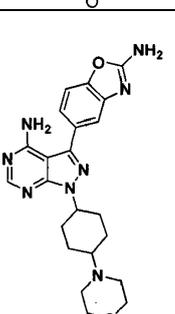
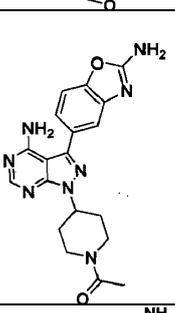
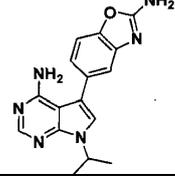
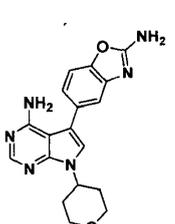
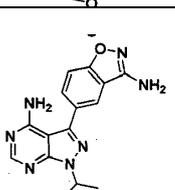
Esquema N' y N-1''

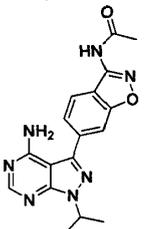
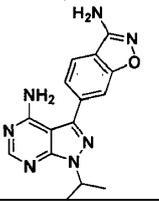
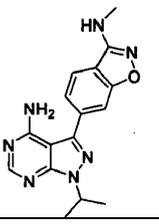
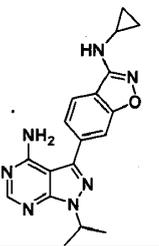
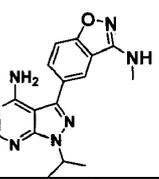
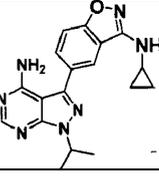
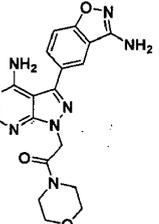


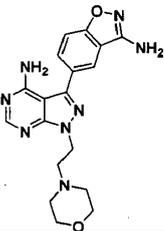
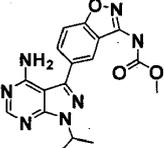
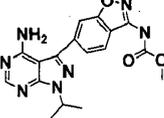
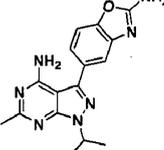
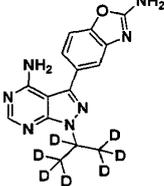
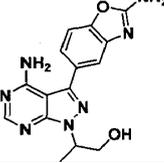
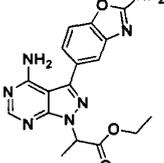
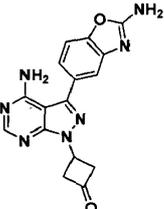
- 5 Además, la invención incluye métodos de síntesis de los compuestos de A, B, B', B'', C, E, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, N-1 o N-3, en los que uno o más de M, M<sub>1</sub> o R<sub>1</sub> tiene un grupo protector presente durante una o más etapas de la síntesis. Se conocen bien en la técnica grupos protectores adecuados para su uso para un resto M, M<sub>1</sub> o R<sub>1</sub>, así como los métodos de incorporación y eliminación, y los reactivos adecuados para dichas transformaciones.
- 10 Los compuestos de la invención donde X<sub>4</sub> es C-R<sup>9</sup> puede prepararse mediante métodos análogos a los descritos en los Esquemas que se han ilustrado anteriormente.

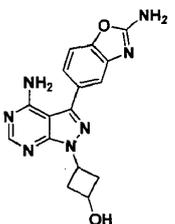
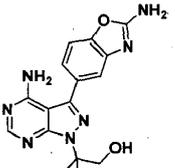
Tabla 1. Actividad biológica del compuesto de la invención (1) y de varios otros compuestos ilustrativos.

	Estructura	mTOR Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K α Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K β Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K γ Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K δ Cl <sub>50</sub> (nM)	PC3 EC <sub>50</sub> (nM)
1		++++	+++	++	++++	+++	++++
2		++++	++	+	+++	+++	+++
3		++	+	++	++	++	

	Estructura	mTOR $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\alpha$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\beta$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\gamma$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\delta$ $Cl_{50}$ (nM)	PC3 $EC_{50}$ (nM)
4		+++	++	++	+++	+++	++
5		++++	+++	++	++++	+++	++++
6		++++	++	+	++	+++	+++
7		++++	+++	++	++	+++	++
8		++++	+++	+	+++	+++	++++
9		++++	++	+	+++	+++	++++
10		++					+

	Estructura	mTOR $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\alpha$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\beta$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\gamma$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\delta$ $Cl_{50}$ (nM)	PC3 $EC_{50}$ (nM)
11		+++					+
12		+++					+
13		++	++		+++	+++	
14		++	++		+++	++	
15		+	+		+	+	
16		+	+		++	+	
17		+	+		+	+	

	Estructura	mTOR Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K α Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K β Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K γ Cl <sub>50</sub> (nM)	PI3K δ Cl <sub>50</sub> (nM)	PC3 EC <sub>50</sub> (nM)
18		+	+		+	+	
19		++	+	+		+	
20		++	++	+		++	
21		+++	+	+	+	+	
22		++++	++++	++	+++	+++	++
23		++++	++	+	++	++	
24			+	+	+	+	
25			+++	++	++++	+++	

	Estructura	mTOR $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\alpha$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\beta$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\gamma$ $Cl_{50}$ (nM)	PI3K $\delta$ $Cl_{50}$ (nM)	PC3 $EC_{50}$ (nM)
26			++++	+++	++++	+++	
27			++	+	+	+++	

La Tabla 1 muestra la actividad biológica en ensayos con mTOR y PI3K quinasa de diversos compuestos, incluyendo el compuesto (1), el compuesto de la invención. La escala utilizada en la Tabla 1 es la siguiente: ++++ menos de 100 nM; +++ menos de 1,0  $\mu$ M; ++ menos que 10  $\mu$ M; y + más de 10  $\mu$ M.

5 Cualquiera de los compuestos mostrados anteriormente puede mostrar una actividad biológica, en un ensayo de inhibición con mTOR o PI3K, de entre aproximadamente 0,5 nM y 25  $\mu$ M ( $Cl_{50}$ ).

10 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 pueden unirse específicamente a una PI3 quinasa o a una proteína quinasa seleccionada del grupo que consiste en mTor, proteína quinasa dependiente de ADN (número de acceso del Pubmed protein (PPAN) AAA79184), Abl tirosina quinasa (CAA52378), Bcr-Abl, quinasa celular hematopoyética (PPAN CA119695), Src (PPAN CAA24495), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (PPAN ABB82619), receptor de factor de crecimiento epidérmico (PPAN AG43241), receptor B4 de EPH (PPAN EAL23820), receptor del factor de células madre (PPAN AAF22141), receptor de tirosina proteína quinasa TIE-2 (PPAN Q028S8), tirosina quinasa 3 relacionada con fms (PPAN NP\_004110), receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PPAN NP\_990080), RET (PPAN CAA 73131), y cualquier otra proteína quinasa indicada en las tablas y figuras que se adjuntan, así como cualquiera de sus mutantes funcionales. En algunas realizaciones, la  $Cl_{50}$  del compuesto de la Tabla 1 para p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  o p110 $\gamma$  es menor de aproximadamente 1  $\mu$ M, menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 50 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM o incluso menor de aproximadamente 0,5 nM. En algunas realizaciones, la  $Cl_{50}$  de un compuesto de la invención para mTor es menor de aproximadamente 1  $\mu$ M, menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 50 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM o incluso menor de aproximadamente 0,5 nM. En algunas otras realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 presentan especificidad de unión doble y tienen la capacidad de inhibir una PI3 quinasa (por ejemplo, una PI3 quinasa de clase I) así como una proteína quinasa (por ejemplo, mTor) con un valor  $Cl_{50}$  menor de aproximadamente 1  $\mu$ M, menor de aproximadamente 100 nM, menor de aproximadamente 50 nM, menor de aproximadamente 10 nM, menor de aproximadamente 1 nM o incluso menor de aproximadamente 0,5 nM. En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 puede ser capaz de inhibir tirosina quinasas incluyendo, por ejemplo, la proteína quinasa dependiente de ADN (número de acceso del Pubmed protein (PPAN) AAA79184), Abl tirosina quinasa (CAA52378), Bcr-Abl, quinasa celular hematopoyética (PPAN CA119695), Src (PPAN CAA24495), receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (PPAN ABB82619), receptor de factor de crecimiento epidérmico (PPAN AG43241), receptor B4 de EPH (PPAN EAL23820), receptor del factor de células madre (PPAN AAF22141), receptor de tirosina proteína quinasa TIE-2 (PPAN Q028S8), tirosina quinasa 3 relacionada con fms (PPAN NP\_004110), receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PPAN NP\_990080), RET (PPAN CAA 73131) y sus mutantes funcionales. En algunas realizaciones, la tirosina quinasa es Abl, Bcr-Abl, EGFR o Flt-3 y cualquier otra quinasa indicada en las tablas del presente documento.

40 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 producen inhibición selectiva de la transducción de señales mediada por mTor en comparación con PI3K aguas arriba. En algunas otras realizaciones, los compuestos proporcionados en el presente documento pueden inhibir la actividad mediada por mTor de un modo más eficaz que la rapamicina, proporcionando por tanto un tratamiento alternativo para las afecciones resistentes a rapamicina.

45 En algunas realizaciones, los compuestos de la Tabla 1 inhiben selectivamente la actividad tanto de mTorC1 como de mTorC2 con respecto a uno, dos, tres o todos los tipos de fosfatidilinositol 3 quinasas (PI3-quinasas) de tipo I. Como se ha indicado anteriormente, las PI3 quinasas de tipo I son PI3-quinasa  $\alpha$ , PI3-quinasa  $\beta$ , PI3-quinasa  $\gamma$  y PI3-quinasa  $\delta$ . Por ejemplo, uno o más compuestos de la invención pueden inhibir mTORC1 y mTORC2 con una

5  $CI_{50}$  que es  $1/10^{\circ}$ ,  $1/20^{\circ}$ ,  $1/25^{\circ}$ ,  $1/50^{\circ}$ ,  $1/100^{\circ}$ ,  $1/200^{\circ}$ ,  $1/300^{\circ}$ ,  $1/400^{\circ}$ ,  $1/500^{\circ}$ ,  $1/1000^{\circ}$ ,  $1/2000^{\circ}$  o menor que la  $CI_{50}$  para una o más PI3-quinasa de tipo I que consiste en PI3-quinasa  $\alpha$ , PI3-quinasa  $\beta$ , PI3-quinasa  $\gamma$  y PI3-quinasa  $\delta$ . En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 es sustancialmente ineficaces inhibiendo una PI3-quinasa de tipo I a una concentración de 100 nM, 200 nM, 500 nM o 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M o 10  $\mu$ M o mayor en un ensayo quinasa *in vitro*.

10 En otras realizaciones, los compuestos de la Tabla 1 que incluye, pero sin limitación, el compuesto 1 y otros mostrados en la Tabla 1, inhiben selectivamente la actividad tanto de mTORC1 como de mTORC2 con respecto a uno, dos, tres o todos los tipos de PI3-quinasa de tipo II o III, por ejemplo, PI3KC2 $\alpha$ , PI3KC2 $\beta$  y VPS34. En particular, uno o más de los compuestos de la invención pueden inhibir mTORC1 y mTORC2 con una  $CI_{50}$  que es  $1/10^{\circ}$ ,  $1/20^{\circ}$ ,  $1/25^{\circ}$ ,  $1/50^{\circ}$ ,  $1/100^{\circ}$ ,  $1/200^{\circ}$ ,  $1/300^{\circ}$ ,  $1/400^{\circ}$ ,  $1/500^{\circ}$ ,  $1/1000^{\circ}$ ,  $1/2000^{\circ}$  o menor que la  $CI_{50}$  para una o más PI3-quinasa de tipo II o III.

15 En otra realización más, los compuestos de la Tabla 1 inhiben selectivamente la actividad tanto de mTORC1 como de mTORC2 con respecto a una o más PI4-quinasa, tales como PI4K $\alpha$  y PI4K $\beta$ . Por ejemplo, uno o más compuestos de la invención pueden inhibir mTORC1 y mTORC2 con una  $CI_{50}$  que es  $1/10^{\circ}$ ,  $1/20^{\circ}$ ,  $1/25^{\circ}$ ,  $1/50^{\circ}$ ,  $1/100^{\circ}$ ,  $1/200^{\circ}$ ,  $1/300^{\circ}$ ,  $1/400^{\circ}$ ,  $1/500^{\circ}$ ,  $1/1000^{\circ}$ ,  $1/2000^{\circ}$  o menor que la  $CI_{50}$  para una o más PI4-quinasa.

20 En otra realización adicional, los compuestos de la Tabla 1 inhiben selectivamente la actividad tanto de mTORC1 como de mTORC2 con respecto a una o más proteína quinasa que incluyen serina/treonina quinasa, tal como ADN-PK (proteína quinasa dependiente de ADN, por las siglas *DNA-Dependent Protein Kinase*). Dicha inhibición selectiva puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, mediante el valor  $CI_{50}$  del compuesto de la invención que puede ser de  $1/2$ ,  $1/3$ ,  $1/4$ ,  $1/5$ ,  $1/6$ ,  $1/10$ ,  $1/15$ ,  $1/20$ ,  $1/25$ ,  $1/30$ ,  $1/40$ ,  $1/100$ ,  $1/200$ ,  $1/300$ ,  $1/400$ ,  $1/500$ ,  $1/1000$ ,  $1/2000$  o menor en comparación con el de una proteína quinasa de referencia. En algunas casos, los compuestos de la invención, que incluyen, pero sin limitación, los mostrados en la Tabla 1, carecen de reactividad cruzada sustancial con al menos aproximadamente 100, 200, 300 o más proteína quinasa distintas de mTORC1 o mTORC2. La ausencia de reactividad cruzada sustancial con otras proteína quinasa que no son mTor puede ponerse de manifiesto, por ejemplo, mediante una actividad de al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o mayor conservada cuando el compuesto de la invención se aplican a la proteína quinasa a una concentración de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M o mayor.

30 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 inhiben selectivamente la actividad de ambas mTor con un valor  $CI_{50}$  de aproximadamente 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 100 pM, 10 pM o incluso 1 pM, o menor según se determina en un ensayo quinasa *in vitro*.

35 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 inhibe la fosforilación de Akt (S473) y Akt (T308) de un modo más eficaz que la rapamicina cuando se ensayan a una concentración molar comparable en un ensayo quinasa *in vitro*.

40 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 compite con el ATP por la unión en sitios de unión al ATP en mTorC1 y/o mTorC2.

45 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 tienen la capacidad de inhibir y/o de otra manera modular la transducción de señales celulares mediante una o más proteína quinasa o lípido quinasa desveladas en el presente documento. Por ejemplo, uno o más compuestos de la invención tienen la capacidad de inhibir o modular el rendimiento de una ruta de transducción de señales. El rendimiento de transducción de señales de una ruta determinada puede medirse por el nivel de fosforilación, desfosforilación, fragmentación, reducción, oxidación de una molécula de señalización en la ruta de interés. En otra realización específica, el rendimiento de la ruta puede ser un rendimiento celular o fenotípico (por ejemplo, la modulación/inhibición de la proliferación celular, muerte celular, apoptosis, autofagia, fagocitosis, progresión del ciclo celular, metástasis, invasión celular, angiogénesis, vascularización, ubiquitinación, traducción, transcripción, tránsito de proteínas, función mitocondrial, función del aparato de Golgi, función del retículo endoplasmático, etc.). En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la invención tienen la capacidad, como ejemplo, de ocasionar la apoptosis, ocasionar la detención del ciclo celular, inhibir la proliferación celular, inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la angiogénesis, inhibir la vascularización, inhibir la metástasis y/o inhibir la invasión celular.

55 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 ocasiona la apoptosis de dicha célula o detiene el ciclo celular. El ciclo celular puede detenerse en la fase G0/G1, en la fase S y/o en la fase G2/M con los compuestos objeto de la invención.

60 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la invención, incluyendo pero sin limitación, los compuestos indicados en la Tabla 1, tienen la capacidad de inhibir la proliferación celular. Por ejemplo, en algunos casos uno o más compuestos indicados en la Tabla 1 pueden inhibir la proliferación de células tumorales o de líneas celulares tumorales con una amplia serie de composiciones genéticas. En algunos casos, los compuestos de la invención puede inhibir la proliferación de células PC3 *in vitro* o en un modelo *in vivo*, tal como un modelo de ratón de xenoinjerto. En algunos casos, la proliferación de células PC3 cultivadas *in vitro* puede inhibirse con una  $CI_{50}$  menor

de 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,1 nM o menor mediante uno o más compuestos de la invención indicados en la Tabla 1.

5 En algunos casos, la fosforilación de AKT puede inhibirse con una  $CI_{50}$  menor de 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,1 nM o menor con uno o más compuestos de la invención indicados en la Tabla 1. La inhibición de la fosforilación de AKT puede bloquearse parcial o completamente con la adición de sangre entera humana. En algunos casos, el uno o más compuestos de la invención indicados en la Tabla 1 presentan unión y/o inhibición específica de mTOR según se pone de manifiesto mediante un pequeño aumento (por ejemplo menor de aproximadamente 0,5 veces, 1 vez, 2 veces o 3 veces) de  $CI_{50}$  para la inhibición de la fosforilación de AKT de células cultivadas en sangre entera en comparación con medios de cultivo convencionales (por ejemplo DMEM, FBS al 10%).

15 En algunos casos, la proliferación de tumores primarios procedentes de sujetos (por ejemplo, de pacientes con cáncer) puede inhibirse con un compuesto de la invención como se muestra en ensayos *in vitro*, o en modelos *in vivo* (por ejemplo, usando las células tumorales del sujeto para generar un modelo de xenoinjerto). En algunos casos, la proliferación de líneas celulares tumorales primarias puede inhibirse con una  $CI_{50}$  menor de 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,1 nM o incluso menor con uno o más compuestos de la invención indicados en la Tabla 1. En algunos casos, la  $CI_{50}$  promedio del compuesto de la invención para inhibir un panel de 10, 20, 30, 40, 50, 100 o más células tumorales primarias puede ser de aproximadamente 200 nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, 25 nM, 15 nM, 10 nM, 5 nM, 3 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,1 nM o incluso menor. Las células tumorales que pueden inhibirse con los compuestos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, células pancreáticas, renales (de riñón), de hueso, nasofaríngeas, gástricas, de estómago, de ovario, de boca, de mama, de sangre, de próstata, de recto, de colon, colorrectales, gliales, neuronales, pulmonares y dérmicas.

25 En algunas realizaciones, el compuesto de la invención es eficaz bloqueando señales de proliferación celular en células con déficit de actividad PTEN pero que expresan PI3K $\alpha$ . En algunos casos, la señalización de la proliferación celular puede inhibirse con el compuesto de la invención incluyendo los indicados en la Tabla 1 como se pone de manifiesto mediante análisis de inmunotransferencia tipo Western de fosforilación de proteínas tales como fosforilación de AKT (fosforilación en T308 o S473), 4EBP1 (fosforilación en S65), S6 (fosforilación en S240/244), FOXO1 (fosforilación en T24/3a T32), GSK3 $\beta$  (fosforilación en S9), PRAS40 (fosforilación en T246) o de MAPK. En algunos casos, los compuestos pueden inhibir la fosforilación de una cualquiera de estas dianas a un mayor grado que la rapamicina en las condiciones ensayadas. En otros casos, los compuestos de la invención pueden inhibir la proliferación de proteínas de señalización y suprimir la proliferación de células que contienen estas proteínas de señalización pero que son resistentes a agentes quimioterapéuticos existentes incluyendo, pero sin limitación, rapamicina, Gleevec, dasatinib, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, alcaloides vegetales, inhibidores de topoisomerasa y otros agentes antitumorales desvelados en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, los compuestos mostrados en la Tabla 1, pueden inhibir células tumorales que comprenden una amplia serie de mutaciones de activación o causantes de tumores. Dichas mutaciones incluyen, pero sin limitación, mutaciones en KRAS, PI3K $C\alpha$ , BRAF, TSC1/2, PBK clase A, LAT1 y PTEN. Por ejemplo, uno o más compuestos de la Tabla 1, incluyendo el compuesto 1, pueden inhibir la proliferación de células tumorales que comprenden mutaciones en KRAS en G12, G13 o mutaciones en Q61, incluyendo pero sin limitación, las mutaciones G12V, G12S, G13D, Q61K y Q61H. En otro ejemplo, uno o más de estos compuestos pueden inhibir la proliferación de células tumorales que comprenden mutaciones en BRAF en V600, incluyendo pero sin limitación, la mutación V600E. En otro ejemplo, uno o más compuestos de la Tabla 1 puede inhibir la proliferación de células tumorales que comprenden una mutación en PI3K $C\alpha$  en E545, P449 o H1047 incluyendo pero sin limitación las mutaciones E545K, H1047R y P449T. En otro ejemplo adicional, uno o más compuestos de la Tabla 1, pueden inhibir la proliferación de células tumorales que comprenden mutaciones de activación en una o más combinaciones de genes tales como por ejemplo mutaciones de activación en PTEN y KRAS, PTEN y BRAF o PTEN y PI3K $C\alpha$ . En otro ejemplo más, uno o más compuestos de la Tabla 1 pueden inhibir células tumorales o líneas de células tumorales que comprenden mutaciones de activación en una o más combinaciones de genes tales como, por ejemplo, mutaciones de activación en BRAF y PI3K $C\alpha$ .

55 En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la Tabla 1 puede ocasionar la detención del ciclo celular. En algunos casos, las células tratadas con el compuesto 1 y con otros de la Tabla 1, pueden detenerse o tardar más en proseguir a través de una o más fases del ciclo celular tal como G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S o G<sub>2</sub>/M. Por ejemplo, las células tratadas con uno o más compuestos de la Tabla 1 pueden detenerse o tardar más en proseguir a través de la fase de ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. En algunos casos, aproximadamente el 35 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o más de las células tratadas con uno o más compuestos de la invención puede estar en la fase del ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. En algunos casos, las células que presentan detención del ciclo celular en la fase de ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en respuesta al tratamiento con los compuestos de la invención, son células tumorales o células que se dividen rápidamente. En algunos casos, las células que presentan detención del ciclo celular en la fase del ciclo celular G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en respuesta al tratamiento con uno o más compuestos de la presente invención son células HCT116 o células SW620. En algunos casos, uno o más compuestos de la Tabla 1, incluyendo, pero sin limitación, el compuesto 1, presentan un grado comparable o mayor de detención en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en comparación con un inhibidor que inhibe una o más PI3-quinazas. En

algunos casos, los compuestos de la invención efectúan un grado comparable o mayor de detención en  $G_0/G_1$  en comparación con un inhibidor que inhibe tanto mTOR como una o más PI3K en células tumorales. En algunos casos, los compuestos de la invención efectúan un grado comparable o mayor de detención en  $G_0/G_1$  en comparación con rapamicina o doxorrubicina.

5 En algunas realizaciones, la señalización celular en células tumorales xenoinjertadas en ratones desnudos atímicos hembra puede inhibirse con uno o más compuestos de la Tabla 1, incluyendo pero sin limitación, el compuesto 1. En algunos casos, la señalización celular puede inhibirse con estos compuestos puestos, como se pone de manifiesto mediante detección por inmunotransferencia tipo Western de fosforilación de proteínas extraídas de tumores  
10 homogeneizados, tal como fosforilación de AKT en T308 o S473, fosforilación de 4EBP1 en S65, fosforilación de S6 en S240/244. En algunos casos, la inhibición de la fosforilación puede ser comparable a, o mayor que, la proporcionada por inhibidores de fosforilación conocidos, tales como un inhibidor Pan PI3K que también inhibe una o más isoformas de mTOR (inhibidor Pan PI3K/mTor) en las condiciones ensayadas. En otros casos, uno o más compuestos de la invención pueden inhibir la fosforilación de proteínas que no se ven afectadas por otros  
15 inhibidores, tales como inhibidores Pan PI3K/mTor, o que tienen poco efecto, por ejemplo, sobre la fosforilación de AKT en T308 y S473.

En algunas realizaciones, el compuesto 1 y otros mostrados en la Tabla 1, producen una reducción en el volumen del tumor de tumores de xenoinjerto en ratones atímicos desnudos hembra. Por ejemplo, el tratamiento con uno o  
20 más compuestos de la invención da como resultado una reducción en el crecimiento o volumen del tumor causada por la injertación de células tumorales U87-MG, A549, ZR-75-1 o 786-O en ratones desnudos. El compuesto de la invención puede administrarse por vía oral, subcutánea o intravenosa, o por cualquier otro método de administración de compuestos proporcionado en el presente documento. En algunos casos, los compuestos pueden administrarse una vez a la semana, cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, cuatro veces al día o más.  
25 En algunos casos, se administran 0,01 mg/kg de compuesto, o se administran 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg o más de compuesto a la vez. En algunos casos, puede detectarse una reducción significativa en el volumen del tumor al cabo de 5, 10, 15, 20, 25 o 30 días del injerto tumoral.

30 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la invención. En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos tales como trastornos hiperproliferativos, incluyendo pero sin limitación, cánceres tales como leucemia mieloide aguda, linfoma, cáncer de timo, de cerebro, de células escamosas, de piel, ocular, retinoblastoma, melanoma intraocular, mesotelioma, de mediastino, de la cavidad oral y orofaríngea, de vejiga, gástrico, de estómago, pancreático, de  
35 mama, de cuello uterino, de cabeza, de cuello, renal, de riñón, de hígado, del sistema hepatobiliar, de intestino delgado, de colon, de recto, de ano, endometrial, de próstata, colorrectal, uretra, esofágico, testicular, ginecológico, de pene, de testículo, de ovario, del sistema endocrino, tiroideo, del SNC, SNP, cánceres relacionados con SIDA (por ejemplo, Linfoma y Sarcoma de Kaposi), otros cánceres inducidos por virus, sarcomas de tejido blando y hueso y melanomas de origen cutáneo e intraocular. Los cánceres incluyen tumores sólidos así como neoplasias malignas hematológicas. Además, puede tratarse un cáncer en cualquier estado de progresión, tal como un cáncer primario,  
40 metastásico y recurrente.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de trastornos oftálmicos. La composición se formula para administración ocular y contiene una cantidad eficaz de un compuesto  
45 de la presente invención y un excipiente farmacéutico adecuado para la administración ocular. Las composiciones farmacéuticas de la invención, adecuadas para la administración ocular, pueden presentarse como formas de dosificación individuales, tales como gotas o pulverizaciones conteniendo cada una de ellas, una cantidad predeterminada de un principio activo, una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Pueden prepararse gotas oculares disolviendo  
50 el principio activo en una solución acuosa estéril tal como solución salina fisiológica, solución tampón, etc., o combinando composiciones en polvo para disolverlas antes de su uso. Como se sabe de la técnica, pueden seleccionarse otros vehículos, entre los que se incluye, pero sin limitación: solución salina equilibrada, solución salina, polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, polivinilos, tal como alcohol polivinílico y povidona, derivados de celulosa tales como metilcelulosa e hidroxipropil metilcelulosa, derivados de petróleo tal como aceite mineral y vaselina blanca, grasas animales tales como lanolina, polímeros de ácido acrílico tales como gel de carboxipolimetileno, grasas vegetales tales como aceite de cacahuete y polisacáridos tales como dextranos y glucosaminoglucanos tales como hialuronato sódico. Si se desea, pueden añadirse aditivos habitualmente utilizados en las gotas oculares. Dichos aditivos incluyen agentes isotonicantes (por ejemplo, cloruro de sodio, etc.), agentes tampón (por ejemplo, ácido bórico, monohidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofostato de sodio, etc.), conservantes (por ejemplo, cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, clorobutanol, etc.), espesantes (por ejemplo sacáridos tales como lactosa, manitol, maltosa, etc.; por ejemplo, ácido hialurónico o su sal tal como hialuronato de sodio, hialuronato de potasio, etc.; por ejemplo, mucopolisacárido tal como sulfato de condroitín, etc., por ejemplo, poliacrilato de sodio, polímero de carboxivinilo, poliacrilato reticulado, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxilpropil metilcelulosa, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxilpropil celulosa u otros  
65 agentes conocidos por los expertos en la técnica).

- Las composiciones farmacéuticas en cuestión se formulan típicamente para proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la presente invención como el principio activo, o una sal, éster, profármaco, solvato, hidrato o derivados de los mismos, farmacéuticamente aceptables. Cuando se desee, las composiciones farmacéuticas contienen la sal y/o su complejo de coordinación farmacéuticamente aceptable, y uno o más excipientes, transportadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitación diluyentes y cargas sólidas inertes, diluyentes, solución acuosa estéril y diversos disolventes orgánicos, potenciadores de difusión, solubilizantes y adyuvantes.
- Las composiciones farmacéuticas en cuestión pueden administrarse en solitario o en combinación con uno o más agentes distintos, que también se administran típicamente en forma de composiciones farmacéuticas. Cuando se desee, el compuesto de la invención y el otro (u otros) agente puede mezclarse en una preparación o ambos componentes pueden formularse en preparaciones distintas para usarlos en combinación por separado o al mismo tiempo.
- En algunas realizaciones, la concentración de uno o más compuestos proporcionados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención es menor que 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 % o 0,0001 % p/p, p/v o v/v.
- En algunas realizaciones, la concentración del compuesto de la invención es mayor que 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 19,75 %, 19,50 %, 19,25 %, 19 %, 18,75 %, 18,50 %, 18,25 %, 18 %, 17,75 %, 17,50 %, 17,25 %, 17 %, 16,75 %, 16,50 %, 16,25 %, 16 %, 15,75 %, 15,50 %, 15,25 %, 15 %, 14,75 %, 14,50 %, 14,25 %, 14 %, 13,75 %, 13,50 %, 13,25 %, 13 %, 12,75 %, 12,50 %, 12,25 %, 12 %, 11,75 %, 11,50 %, 11,25 %, 11 %, 10,75 %, 10,50 %, 10,25 %, 10 %, 9,75 %, 9,50 %, 9,25 %, 9 %, 8,75 %, 8,50 %, 8,25 %, 8 %, 7,75 %, 7,50 %, 7,25 %, 7 %, 6,75 %, 6,50 %, 6,25 %, 6 %, 5,75 %, 5,50 %, 5,25 %, 5 %, 4,75 %, 4,50 %, 4,25 %, 4 %, 3,75 %, 3,50 %, 3,25 %, 3 %, 2,75 %, 2,50 %, 2,25 %, 2 %, 1,75 %, 1,50 %, 1,25 %, 1 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,09 %, 0,08 %, 0,07 %, 0,06 %, 0,05 %, 0,04 %, 0,03 %, 0,02 %, 0,01 %, 0,009 %, 0,008 %, 0,007 %, 0,006 %, 0,005 %, 0,004 %, 0,003 %, 0,002 %, 0,001 %, 0,0009 %, 0,0008 %, 0,0007 %, 0,0006 %, 0,0005 %, 0,0004 %, 0,0003 %, 0,0002 %, o 0,0001 % p/p, p/v o v/v.
- En algunas realizaciones, la concentración del compuesto de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 40 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 30 %, de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 29 %, de aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 28 %, de aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 27 %, de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 26 %, de aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 25 %, de aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 24 %, de aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 23 %, de aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 22 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 21 %, de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 20 %, de aproximadamente 0,3 % a aproximadamente 19 %, de aproximadamente 0,4 % a aproximadamente 18 %, de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 17 %, de aproximadamente 0,6 % a aproximadamente 16 %, de aproximadamente 0,7 % a aproximadamente 15 %, de aproximadamente 0,8 % a aproximadamente 14 %, de aproximadamente 0,9 % a aproximadamente 12 %, de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/p, p/v o v/v.
- En algunas realizaciones la concentración del compuesto de la invención está en el intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 10 %, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 5 %, de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 4,5 %, de aproximadamente 0,03 % a aproximadamente 4 %, de aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 3,5 %, de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %, de aproximadamente 0,06 % a aproximadamente 2,5 %, de aproximadamente 0,07 % a aproximadamente 2 %, de aproximadamente 0,08 % a aproximadamente 1,5 %, de aproximadamente 0,09 % a aproximadamente 1 %, de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 0,9 % p/p, p/v o v/v.
- En algunas realizaciones, la cantidad del compuesto de la invención es igual a o menor que 10 g, 9,5 g, 9,0 g, 8,5 g, 8,0 g, 7,5 g, 7,0 g, 6,5 g, 6,0 g, 5,5 g, 5,0 g, 4,5 g, 4,0 g, 3,5 g, 3,0 g, 2,5 g, 2,0 g, 1,5 g, 1,0 g, 0,95 g, 0,9 g, 0,85 g, 0,8 g, 0,75 g, 0,7 g, 0,65 g, 0,6 g, 0,55 g, 0,5 g, 0,45 g, 0,4 g, 0,35 g, 0,3 g, 0,25 g, 0,2 g, 0,15 g, 0,1 g, 0,09 g, 0,08 g, 0,07 g, 0,06 g, 0,05 g, 0,04 g, 0,03 g, 0,02 g, 0,01 g, 0,009 g, 0,008 g, 0,007 g, 0,006 g, 0,005 g, 0,004 g, 0,003 g, 0,002 g, 0,001 g, 0,0009 g, 0,0008 g, 0,0007 g, 0,0006 g, 0,0005 g, 0,0004 g, 0,0003 g, 0,0002 g o 0,0001 g.
- En algunas realizaciones, la cantidad del compuesto de la invención es más que 0,0001 g, 0,0002 g, 0,0003 g, 0,0004 g, 0,0005 g, 0,0006 g, 0,0007 g, 0,0008 g, 0,0009 g, 0,001 g, 0,0015 g, 0,002 g, 0,0025 g, 0,003 g, 0,0035 g, 0,004 g, 0,0045 g, 0,005 g, 0,0055 g, 0,006 g, 0,0065 g, 0,007 g, 0,0075 g, 0,008 g, 0,0085 g, 0,009 g, 0,0095 g, 0,01 g, 0,015 g, 0,02 g, 0,025 g, 0,03 g, 0,035 g, 0,04 g, 0,045 g, 0,05 g, 0,055 g, 0,06 g, 0,065 g, 0,07 g, 0,075 g, 0,08 g, 0,085 g, 0,09 g, 0,095 g, 0,1 g, 0,15 g, 0,2 g, 0,25 g, 0,3 g, 0,35 g, 0,4 g, 0,45 g, 0,5 g, 0,55 g, 0,6 g, 0,65 g, 0,7 g, 0,75 g, 0,8 g, 0,85 g, 0,9 g, 0,95 g, 1 g, 1,5 g, 2 g, 2,5 g, 3 g, 3,5 g, 4 g, 4,5 g, 5 g, 5,5 g, 6 g, 6,5 g, 7 g, 7,5 g, 8 g, 8,5 g, 9 g, 9,5 g o 10 g.

En algunas realizaciones, la cantidad del compuesto de la invención está en el intervalo de 0,001-10 g, 0,0005-9 g, 0,001-8 g, 0,005-7 g, 0,01-6 g, 0,05-5 g, 0,1-4 g, 0,5-4 g o 1-3 g.

5 El compuesto de acuerdo con la invención es eficaz sobre un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, en el tratamiento de adultos humanos, las dosificaciones de 0,01 a 1000 mg, de 0,5 a 100 mg, de 1 a 50 mg al día y de 5 a 40 mg al día son ejemplos de dosificaciones que pueden usarse. Una dosificación ejemplar es de 10 a 30 mg por día. La dosificación exacta dependerá de la vía de administración, de la forma en la que se administre el compuesto, del sujeto que vaya a tratarse, del peso corporal del sujeto a tratar y de las preferencias y experiencia del médico tratante.

10 Una composición farmacéutica de la invención típicamente contiene un principio activo (por ejemplo, un compuesto) de la presente invención o una sal y/o su complejo de coordinación farmacéuticamente aceptable, y uno o más excipientes, transportadores farmacéuticamente aceptables, incluyendo, pero sin limitación diluyentes y cargas sólidas inertes, diluyentes, solución acuosa estéril y diversos disolventes orgánicos, potenciadores de difusión, solubilizantes y adyuvantes.

A continuación se describen composiciones farmacéuticas ejemplares no limitantes y métodos para prepararlas.

20 Composiciones farmacéuticas para administración oral. En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para administración oral que contiene el compuesto de la invención y un excipiente farmacéutico adecuado para administración oral.

25 En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica sólida para administración oral que contiene: (i) una cantidad eficaz del compuesto de la invención; opcionalmente (ii) una cantidad eficaz de un segundo agente; y (iii) un excipiente farmacéutico adecuado para la administración oral. En algunas realizaciones, la composición contiene adicionalmente: (iv) una cantidad eficaz de un tercer agente.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede ser una composición farmacéutica líquida adecuada para consumo oral. Las composiciones farmacéuticas de la invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como formas de dosificación individuales, tales como cápsulas, obleas o comprimidos o líquidos o pulverizaciones líquidas o en aerosol conteniendo cada una de ellas una cantidad predeterminada de un principio activo como un polvo o en gránulos, una solución, o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, una emulsión de aceite en agua, o una emulsión líquida de agua en aceite. Dichas formas de dosificación pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos farmacéuticos, pero todos los métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el transportador, que constituye uno o más principios necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el principio activo con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos y después, si fuera necesario, dar forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse por comprensión o moldeo, opcionalmente con uno o más principios accesorios. Los comprimidos elaborados por compresión pueden prepararse comprimiendo en un aparato adecuado el principio activo en una forma fluida, tal como polvos o gránulos, opcionalmente mezclados con un excipiente tal como, pero sin limitación, un aglutinante, un lubricante, un diluyente inerte y/o un tensioactivo o agente de dispersión. Pueden prepararse comprimidos moldeados, moldeando en un aparato adecuado una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

45 La presente invención incluye adicionalmente composiciones farmacéuticas anhidras y formas de dosificación que comprenden un principio activo, dado que el agua puede facilitar la degradación de algunos compuestos. Por ejemplo, en la técnica farmacéutica puede añadirse agua (por ejemplo, 5 %) como un medio de simulación de conservación prolongada para determinar características tales como vida útil o estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo. Las composiciones farmacéuticas anhidras y las formas de dosificación de la invención pueden prepararse usando principios anhidros o que contengan poca humedad y condiciones con poca condensación o poco húmedas. Las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación de la invención que contienen lactosa pueden hacerse anhidras si se espera que haya contacto sustancial con condensación y/o humedad durante la elaboración, envasado y/o conservación. Una composición farmacéutica anhidra puede prepararse y conservarse de tal manera que se conserve su naturaleza anhidra. Por consiguiente, las composiciones anhidras pueden envasarse usando materiales que se sabe que impiden la exposición al agua de tal manera que pueden incluirse en kits de farmacia adecuados. Como ejemplos de envases adecuados se incluyen, pero sin limitación, papel de aluminio herméticamente sellado, plásticos o similares, recipientes monodosis, paquetes blíster y paquetes con tira.

60 Un principio activo puede combinarse en una mezcla íntima con un transportador farmacéutico de acuerdo con las técnicas de preparación de compuestos farmacéuticos convencionales. El transportador puede adoptar una amplia diversidad de formas dependiendo de la forma de la preparación deseada para la administración. En la preparación de las composiciones para una forma de dosificación oral, como transportadores puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saporíferos, conservantes, agentes colorantes y similares, en el caso de preparaciones orales líquidas (tales como suspensiones, soluciones y elixires) o aerosoles; o transportadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina,

65

diluyentes, agentes de granulaci3n, lubricantes, aglutinantes y agentes de disgregantes pueden usarse en el caso de preparaciones s3lidas orales, en algunas realizaciones sin emplear el uso de lactosa. Por ejemplo, como transportadores adecuados se incluyen polvos, c3psulas y comprimidos con las preparaciones orales s3lidas. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse mediante t3cnicas acuosas o no acuosas convencionales.

5 Los aglutinantes adecuados para su uso en las composiciones farmac3uticas y formas de dosificaci3n incluyen, pero sin limitaci3n, almid3n de ma3z, almid3n de patata u otros almidones, gelatina, gomas naturales y sint3ticas tales como goma ar3biga, alginato s3dico, 3cido alg3nico, otros alginatos, tragacanto en polvo, goma guar, celulosa y sus derivados (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa de calcio, carboximetil celulosa s3dica), polivinil pirrolidona, metilcelulosa, almid3n pregelatinizado, hidroxipropil metilcelulosa, celulosa microcristalina y mezclas de los mismos.

10 Como ejemplos de cargas adecuadas para su uso en las composiciones farmac3uticas y formas de dosificaci3n desveladas en el presente documento se incluyen, pero sin limitaci3n talco, carbonato c3lcico (por ejemplo, gr3nulos o polvo), celulosa microcristalina, celulosa en polvo, dextratos, caol3n, manitol, 3cido sil3cico, sorbitol, almid3n, almid3n pregelatinizado y mezcla de los mismos.

15 Los disgregantes pueden usarse en las composiciones de la invenci3n para proporcionar comprimidos que se disgregan cuando se exponen a un medio acuoso. Un exceso de disgregante puede producir comprimidos que pueden disgregarse en el frasco. Demasiado poco puede ser insuficiente para que se produzca la disgregaci3n y por tanto puede alterar la velocidad y el grado de liberaci3n del principio (o principios) activo de la forma de dosificaci3n. Por tanto, puede usarse una cantidad suficiente de disgregante, que no sea ni demasiado peque1a ni demasiado grande, como para alterar perjudicialmente la liberaci3n del principio (o principios) activo, para formar las formas de dosificaci3n del compuesto desvelado en el presente documento. La cantidad de disgregante usada puede variar en funci3n del tipo de formulaci3n y del modo de administraci3n, y puede ser f3cilmente discernible para los expertos en la t3cnica. En la composici3n farmac3utica puede usarse de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 15 por ciento en peso de disgregante, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de disgregante. Los disgregantes que pueden usarse para formar las composiciones farmac3uticas y las formas de dosificaci3n de la invenci3n incluyen, pero sin limitaci3n, agar-agar, 3cido alg3nico, carbonato c3lcico, celulosa microcristalina, croscarmelosa s3dica, crospovidona, polacrilina pot3sica, glicolato s3dico de almid3n, almid3n de patata o tapioca, otros almidones, almid3n pregelatinizado, otros almidones, arcillas, otras alginas, otras celulosas, gomas o mezclas de los mismos.

20 Los lubricantes que pueden usarse para formar las composiciones farmac3uticas y formas de dosificaci3n de la invenci3n incluyen, pero sin limitaci3n, estearato de calcio, estearato de magnesio, aceite mineral, aceite mineral ligero, glicerina, sorbitol, manitol, polietilenglicol, otros glicoles, 3cido este3rico, lauril sulfato s3dico, talco, aceite vegetal hidrogenado, (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algod3n, aceite de girasol, aceite de s3samo, aceite de oliva, aceite de ma3z y aceite de soja), estearato de cinc, etil oleato, etil laureato, agar, o mezclas de los mismos. Los lubricantes adicionales incluyen, por ejemplo, un gel de silice siloideo, un aerosol coagulado de silice sint3tico o mezclas de los mismos. Opcionalmente puede a1adirse un lubricante en una cantidad de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de la composici3n farmac3utica.

25 Cuando para la administraci3n oral se desean suspensiones acuosas y/o elixires, el principio activo en su interior puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o sapor3feros, material colorante o colorantes y, si se desea, agentes emulsionantes y/o de suspensi3n, junto con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol, glicerina y diversas combinaciones de los mismos.

30 Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse con t3cnicas conocidas para retrasar la disgregaci3n y absorci3n en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo una acci3n prolongada durante m3s tiempo. Por ejemplo, puede emplearse un material de acci3n retardada, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral tambi3n pueden presentarse como c3psulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente s3lido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caol3n, o como c3psulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o con un medio oleaginoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina l3quida o aceite de oliva.

35 Los tensioactivos que pueden usarse para formar las composiciones farmac3uticas y las formas de dosificaci3n de la invenci3n incluyen, pero sin limitaci3n, tensioactivos hidr3filos, tensioactivos lip3filos y mezclas de los mismos. Es decir, puede emplearse una mezcla de tensioactivos hidr3filos, una mezcla de tensioactivos lip3filos o una mezcla de al menos un tensioactivo hidr3filo y al menos un tensioactivo lip3filo.

40 Un tensioactivo hidr3filo adecuado puede tener generalmente un valor HLB de al menos 10, aunque los tensioactivos lip3filos adecuados pueden tener generalmente un valor HLB de menos de aproximadamente 10. Un par3metro emp3rico que se usa para caracterizar la hidrofilia e hidrofobia relativas de los compuestos anf3filicos no i3nicos es el equilibrio hidr3filo-lip3filo (valor "HLB", acr3nimo ingl3s de *Hydrophilic-Lipophilic Balance*). Los tensioactivos con valores HLB m3s bajos son los m3s lip3filos o hidr3fobos, y tienen una mayor solubilidad en aceites, mientras que los tensioactivos con valores HLB m3s altos son m3s hidr3filos, y tienen mayor solubilidad en

soluciones acuosas. Generalmente se considera que los tensioactivos hidrófilos son aquellos compuestos que tienen un valor HLB mayor de aproximadamente 10, así como los compuestos aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos para los que la escala HLB no es generalmente aplicable. De manera similar, los tensioactivos lipófilos (es decir, hidrófobos) son compuestos que tienen un valor HLB igual a o menor que aproximadamente 10. Sin embargo, un valor HLB de un tensioactivo es simplemente una orientación preliminar generalmente usada para permitir la formulación de emulsiones industriales, farmacéuticas y cosméticas.

Los tensioactivos hidrófilos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos iónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, sales de alquilamonio; sales de ácido fusídico; derivados de aminoácidos de ácidos grasos, oligopéptidos y polipéptidos; derivados de aminoácidos de glicéridos, oligopéptidos y polipéptidos; lecitinas y lecitinas hidrogenadas; lisolecitinas y lisolecitinas hidrogenadas; fosfolípidos y sus derivados; lisofosfolípidos y sus derivados; sales de éster de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato sódico; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico de mono- y diglicéridos mono y diacetilados; mono- y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

Dentro del grupo anteriormente mencionado, los tensioactivos iónicos incluyen, a modo de ejemplo: lecitinas, lisolecitina, fosfolípidos, lisofosfolípidos y sus derivados; sales de éster de ácido graso de carnitina; sales de alquilsulfatos; sales de ácidos grasos; docusato sódico; acilactilatos; ésteres de ácido tartárico de mono- y diglicéridos mono y diacetilados; mono- y diglicéridos succinilados; ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos; y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos iónicos pueden ser las formas ionizadas de lecitina, lisolecitina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidil etanolamina, lisofosfatidilglicerol, ácido lisofosfatídico, lisofosfatidilserina, PEG-fosfatidiletanolamina, PVP-fosfatidiletanolamina, ésteres lácticos de ácidos grasos, estearoil-2-lactilato, estearoil lactilato, monoglicéridos succinilados, ésteres de ácido tartárico de mono/diglicéridos mono/diacetilados, ésteres de ácido cítrico de mono/diglicéridos, colilsarcosina, caproato, caprilato, caprato, laurato, miristato, palmitato, oleato, ricinoleato, linoleato, linolenato, estearato, lauril sulfato, teracecil sulfato, docusato, lauroil carnitinas, palmitoil carnitinas, miristol carnitinas y sales y mezclas de los mismos.

Los tensioactivos no iónicos hidrófilos pueden incluir, pero sin limitación, alquilglucósidos; alquilmaltósidos; alquiltioglicósidos; lauril macrogolglicéridos; éteres de polioxialquilenalquilo, tales como éteres polietilenglicolalquilo; alquifenoles de polioxialquilenos tales como alquifenoles de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilenos alquil fenol, tales como monoésteres de ácidos grasos de polietilenglicol y diésteres de ácidos grasos de polietilenglicol; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol glicerol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol; ésteres de ácidos grasos de polioxialquilen sorbitan tales como ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitan; productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos, y esteroides; esteroides de polioxietileno, derivados y análogos de los mismos; vitaminas polioxietiladas y derivadas de las mismas; copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno; y mezclas de los mismos; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitan y productos de transesterificación hidrófilos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en triglicéridos, aceites vegetales y aceites vegetales hidrogenados. El poliol puede ser glicerol, etilenglicol, polietilenglicol glicol, sorbitol, propilenglicol, pentaeritritol o un sacárido.

Otros tensioactivos no iónicos hidrófilos incluyen, sin limitación, PEG-10 laurato, PEG-12 laurato, PEG-20 laurato, PEG-32 laurato, PEG-32 dilaurato, PEG-12-oleato, PEG-15 oleato, PEG-20 oleato, PEG-20 dioleato, PEG-32 oleato, PEG-200 oleato, PEG-400 oleato, PEG-15 estearato, PEG-32 diestearato, PEG-40 estearato, PEG-100 estearato, PEG-20 dilaurato, PEG-25 glicerol trioleato, PEG-32 dioleato, PEG-20 gliceril laurato, PEG-30 gliceril laurato, PEG-20 gliceril estearato, PEG-20 gliceril oleato, PEG-30 gliceril oleato, PEG-30 gliceril laurato, PEG-40 gliceril laurato, PEG-40 aceite de grano de palma, PEG-50 aceite de ricino hidrogenado, PEG-40 aceite de ricino, PEG-35 aceite de ricino, PEG-60 aceite de ricino, PEG-40 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de ricino hidrogenado, PEG-60 aceite de maíz, PEG-6 glicéridos de caprato/caprilato, PEG-8 glicéridos de caprato/caprilato, poligliceril-10 laurato, PEG-30 colesterol, PEG-25 fitoesterol, PEG-30 esteroil de soja, PEG-20 trioleato, PEG-40 sorbitan oleato, PEG-80 sorbitan laurato, polisorbato 20, polisorbato 80, POE-9 lauril éter, POE-23 lauril éter, POE-10 oleil éter, POE-20 oleil éter, POE-20 estearil éter, tocoferil PEG-100 succinato, PEG-24 colesterol, poligliceril-10 oleato, Tween 40, Tween 60, monostearato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monopalmitato de sacarosa, PEG 10-100 de la serie nonil fenol, PEG 15-100 de la serie octil fenol y poloxámeros.

Los tensioactivos lipófilos adecuados incluyen, a modo únicamente de ejemplo: alcoholes grasos; ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de glicerol acetilado; ésteres de ácidos grasos de alcohol inferior; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos de sorbitan; ésteres de ácidos grasos de sorbitan de polietilenglicol; esteroides y derivados de esteroil; esteroides polioxietilados y derivados de esteroil; éteres de polietileno alquilglicol; ésteres de azúcar, éteres de azúcar; derivados de ácido láctico de mono- y di-glicéridos; productos de transesterificación hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en glicéridos, aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados, ácidos grasos y esteroides; vitaminas solubles en aceite/derivados de vitaminas; y mezclas de las mismas. Dentro de este grupo, los tensioactivos lipófilos preferidos

incluyen ésteres de ácidos grasos de glicerol; ésteres de ácidos grasos de propilenglicol y mezclas de los mismos o son productos de transesterificación de hidrófobos de un poliol con al menos un miembro del grupo que consiste en aceites vegetales, aceites vegetales hidrogenados y triglicéridos.

- 5 En una realización, la composición puede incluir un solubilizante para asegurar una buena solubilización y/o disolución del compuesto de la presente invención y minimizar la precipitación del compuesto de la presente invención. Esto puede ser especialmente importante para composiciones de uso no oral, por ejemplo, composiciones para inyección. También puede añadirse un solubilizante para aumentar la solubilidad del fármaco hidrófilo y/u otros componentes, tales como tensioactivos, o para mantener la composición como una solución o  
10 dispersión estable u homogénea.

Como ejemplos de solubilizantes adecuados se incluyen, pero sin limitación, los siguientes: alcoholes y polioles, tales como etanol, isopropanol, butanol, alcohol bencílico, etilenglicol, propilenglicol, butanodiolos e isómeros de los mismos; glicerol, pentaeritritol, sorbitol, manitol, transcitol, dimetil isosorbido, polietilenglicol, polipropilenglicol, alcohol polivinílico, hidroxipropil metilcelulosa y otros derivados de celulosa, ciclodextrinas y derivados de ciclodextrina; éteres de polietilenglicoles que tienen un peso molecular promedio de aproximadamente 200 a aproximadamente 6000, tal como éter PEG de alcohol tetrahidrofurfurilo (glucofuro) o metoxi PEG; amidas y otros compuestos que contienen nitrógeno tales como 2-pirrolidona, 2-piperidona,  $\epsilon$ -caprolactama, *N*-alquilpirrolidona, *N*-hidroxialquilpirrolidona, *N*-alquilpiperidona, *N*-alquicaprolactama, dimetilacetamida y polivinilpirrolidona; éteres tales como etil propionato, tributilcitrato, acetil trietilcitrato, acetil tributil citrato, trietilcitrato, etil oleato, etil caprilato, etil butirato, triacetina, monoacetato de propilenglicol, diacetato de propilenglicol,  $\epsilon$ -caprolactona e isómeros de los mismos,  $\delta$ -valerolactona e isómeros de los mismos,  $\beta$ -butirolactona e isómeros de los mismos; y otros solubilizantes conocidos en la técnica, tales como dimetil acetamida, dimetil isosorbido, *N*-metil pirrolidonas, monoctanoína, éter dietilenglicol monoetílico y agua.

También pueden usarse mezclas de solubilizantes. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, triacetina, trietilcitrato, etil oleato, etil caprilato, dimetilacetamida, *N*-metilpirrolidona, *N*-hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropil metilcelulosa, ciclodextrinas de hidroxipropilo, etanol, polietilenglicol 200-100, glucofuro, transcitol, propilenglicol y dimetil isosorbido. Los solubilizantes particularmente preferidos incluyen sorbitol, glicerol, triacetina, alcohol etílico, PEG 400, glucofuro y propilenglicol.

La cantidad de solubilizante que puede incluirse no está particularmente limitada. La cantidad de un solubilizante determinado puede limitarse a una cantidad bioaceptable, que puede determinarla fácilmente un experto en la técnica. En algunas circunstancias, puede ser ventajoso incluir cantidades de solubilizantes muy por encima de cantidades bioaceptables, por ejemplo, para maximizar la concentración del fármaco, retirando el exceso de solubilizante antes de proporcionar la composición a un sujeto usando técnicas convencionales, tales como destilación o evaporación. Por tanto, si estuviese presente, el solubilizante puede estar en una proporción en peso de 10 %, 25 %, 50 %, 100 %, o hasta aproximadamente 200 % en peso, en función del peso combinado del fármaco y de otros excipientes. Si se desea, también pueden usarse cantidades muy pequeñas de solubilizante, tales como 5 %, 2 %, 1 % o incluso menores. Típicamente, el solubilizante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 100 %, más típicamente de aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 % en peso.

La composición puede incluir adicionalmente uno o más aditivos y excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichos aditivos y excipientes incluyen, sin limitación, antiadherentes; antiespumantes, agentes tampón, polímeros, antioxidantes, conservantes, agentes quelantes, viscomoduladores, tonificantes, saporíferos, colorantes, odorantes, opacantes, agentes de suspensión, aglutinantes, cargas, plastificantes, lubricantes y mezclas de los mismos.

Además, en la composición puede incorporarse un ácido o una base para facilitar el procesamiento, potenciar la estabilidad o por otras razones. Los ejemplos de bases farmacéuticamente aceptables incluyen aminoácidos, ésteres de aminoácidos, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, hidrógeno carbonato de sodio, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, hidróxido de magnesio, silicato de aluminio y magnesio, silicato de aluminio sintético, hidrocalcita sintética, hidróxido de aluminio y magnesio, diisopropiletamina, etanolamina, etilendiamina, trietanolamina, trietilamina, triisopropanolamina, trimetilamina, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) y similares. También son adecuadas bases que son sales de un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido acético, ácido acrílico, ácido adípico, ácido alginico, ácido alcanosulfónico, aminoácidos, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido bórico, ácido butírico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácidos grasos, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido hidroquinosulfónico, ácido isoascórbico, ácido láctico, ácido maleico, ácido oxálico, ácido para-bromofenilsulfónico, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tánico, ácido tartárico, ácido tioglucólico, ácido toluenosulfónico, ácido úrico y similares. También pueden usarse sales de ácidos polipróticos, tales como fosfato de sodio, hidrógeno fosfato disódico y dihidrógeno fosfato de sodio. Cuando la base es una sal, el catión puede ser cualquier catión conveniente y farmacéuticamente aceptable, tal como amoniaco, metales alcalinos, metales alcalinotérreos y similares. Los ejemplos pueden incluir, pero sin limitación, sodio, potasio, litio, magnesio, calcio y amonio.

Los ácidos adecuados son ácidos orgánicos e inorgánicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de ácidos

inorgánicos adecuados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido fosfórico y similares. Los ejemplos de ácidos orgánicos adecuados incluyen ácido acético, ácido acrílico, ácido adipico, ácido algínico, ácido alcanosulfónico, aminoácidos, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido bórico, ácido butírico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácidos grasos, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido hidroquinosulfónico, ácido isoascórbico, ácido láctico, ácido maleico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido para-bromofenilsulfónico, ácido propiónico, ácido *p*-toluenosulfónico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido tánico, ácido tartárico, ácido tioglucólico, ácido toluenosulfónico, ácido úrico y similares.

Composiciones farmacéuticas para inyección. En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para inyección que contiene el compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéutico adecuado para inyección. Los componentes y cantidades de agentes en las composiciones son como se describe en el presente documento.

Las formas en las que las nuevas composiciones de la presente invención pueden incorporarse para administración por inyección incluyen suspensiones, o emulsiones, acuosas u oleaginosas, con aceite de sésamo, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón o aceite de cacahuete, así como elixires, manitol, dextrosa o una solución acuosa estéril y vehículos farmacéuticos similares.

Las soluciones acuosas en solución salina se usan también convencionalmente para inyección. También puede emplearse etanol, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares (y mezclas adecuadas de los mismos), derivados de ciclodextrina y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, usando un recubrimiento, tal como lecitina, para mantener el tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y usando tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede realizarse a través de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el compuesto de la presente invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros ingredientes como se ha indicado anteriormente, si se requiere, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el método de dispersión básico y los otros principios necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación deseables son las técnicas de secado al vacío y la liofilización, que producen un polvo del principio activo más cualquier principio adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada, estéril, de los mismos.

Composiciones farmacéuticas para suministro tópico (por ejemplo, transdérmico). En algunas realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para suministro transdérmico que contiene el compuesto de la presente invención y un excipiente farmacéutico adecuado para el suministro transdérmico.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse en preparaciones en forma sólida, semisólida o líquida, adecuadas para administración local o tópica, tales como geles, gelatinas solubles en agua, cremas, lociones, suspensiones, espumas, polvos, pastas, pomadas, soluciones, aceites, adhesivos, supositorios, pulverizaciones, emulsiones, soluciones salinas, soluciones basadas en dimetilsulfóxido (DMSO). En general, los vehículos con densidades más altas pueden proporcionar una zona con una exposición prolongada a los principios activos. En cambio, una formulación en solución puede proporcionar una exposición más inmediata del principio activo al área seleccionada.

Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos o en fase de gel adecuados, que son compuestos que permiten aumentar la penetración de, o ayudar en el suministro de, moléculas terapéuticas a través de la barrera de permeable del estrato córneo de la piel. Hay muchas de estas moléculas potenciadoras de la penetración conocidas por los expertos formados en la técnica de la formulación por vía tópica. Los ejemplos de dichos transportadores y excipientes incluyen, pero sin limitación, humectantes (por ejemplo, urea), glicoles (por ejemplo, propilenglicol), alcoholes (por ejemplo, etanol), ácidos grasos (por ejemplo, ácido oleico), tensioactivos (por ejemplo, miristato de isopropilo y lauril sulfato sódico), pirrolidonas, monolaurato de glicerol, sulfóxidos, terpenos (por ejemplo, mentol), aminas, amidas, alcanos, alcanoles, agua, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

Otra formulación ejemplar para su uso en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de suministro transdérmico ("parches"). Dichos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar infusión continua o discontinua de un compuesto de la invención en cantidades controladas, con o sin otro agente.

La construcción y el uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos es muy conocida en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 5.023.252, 4.992.445 y 5.001.139. Dichos parches pueden construirse para el suministro continuo, pulsátil, o a demanda, de agentes farmacéuticos.

Composiciones farmacéuticas para inhalación. Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos, o mezclas de los mismos, y polvos, farmacéuticamente

aceptables. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes adecuados farmacéuticamente aceptables como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, las composiciones se administran por vía respiratoria, oral o nasal para un efecto local o sistémico. Preferentemente, las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede estar acoplado a una máscara facial, o a un respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo pueden administrarse, preferentemente, por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

10 Otras composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas también pueden prepararse a partir de composiciones descritas en el presente documento y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para administración sublingual, bucal, rectal, intraósea, intraocular, intranasal, epidural o intraespinal. Las preparaciones para dichas composiciones farmacéuticas son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, eds., *Handbook of Clinical Drug Data*, décima edición, McGraw-Hill, 2002; Pratt y Taylor, eds., *Principles of Drug Action*, tercera edición, Churchill Livingstone, Nueva York, 1990; Katzung, ed., *Basic and Clinical Pharmacology*, novena edición, McGraw Hill, 20037ybg; Goodman y Gilman, eds., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, décima edición, McGraw Hill, 2001; Remingtons Pharmaceutical Sciences, 20ª Ed., Lippincott Williams Y Wilkins., 2000; Martindale, *The Extra Pharmacopoeia*, 32ª edición (The Pharmaceutical Press, Londres, 1999).

20 La administración del compuesto o composición farmacéutica de la presente invención puede efectuarse mediante cualquier método que permita el suministro de los compuestos en el sitio de acción. Estos métodos incluyen las vías de administración oral, intraduodenal, inyección parenteral (incluyendo, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intravascular, intraperitoneal o infusión), tópica (por ejemplo aplicación transdérmica), rectal, suministro por vía local mediante catéter o estent o a través de inhalación. El compuesto también puede administrarse por vía intraadiposa o intratecal.

30 La cantidad del compuesto administrado dependerá del sujeto que vaya a tratarse, de la gravedad del trastorno o afección, de la tasa de administración, de la disposición del compuesto y del criterio del médico tratante. Sin embargo, una dosis eficaz está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis sencillas o divididas. Para un ser humano de 70 kg, esta cantidad sería de aproximadamente 0,05 a 7 g/día, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. En algunos casos, niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis incluso más grandes sin causar ningún efecto secundario adverso, por ejemplo, dividiendo dichas dosis más grandes en varias dosis pequeñas para administración a lo largo del día.

40 En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra en una sola dosis. Típicamente, dicha administración será por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, para introducir el agente rápidamente. Sin embargo, según sea apropiado, pueden usarse otras vías. También puede usarse una sola dosis de un compuesto de la invención para el tratamiento de una afección aguda.

45 En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra en dosis múltiples. La dosificación puede ser de aproximadamente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o más de seis veces al día. La dosificación puede ser de aproximadamente una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana, o una vez cada dos días. En otra realización un compuesto de la invención y otro agente se administran conjuntamente de aproximadamente una vez al día a aproximadamente 6 veces al día. En otra realización la administración de un compuesto de la invención y un agente continúa durante menos de aproximadamente 7 días. En otra realización adicional, la administración continúa durante más de aproximadamente 6, 10, 14, 28 días, dos meses, seis meses o un año. En algunos casos, la dosificación continua se realiza y se mantiene en tanto en cuanto sea necesaria.

55 La administración de los compuestos de la invención puede continuar en tanto en cuanto sea necesaria. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra durante menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra crónicamente sobre una base en curso, por ejemplo, para el tratamiento de efectos crónicos.

60 Una cantidad eficaz del compuesto de la invención puede administrarse bien en dosis sencillas o múltiples mediante cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que tienen similares utilidades incluyendo vía rectal, bucal, intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral, tópica o como un inhalante.

65 Las composiciones de la invención también pueden suministrarse mediante un dispositivo impregnado o recubierto tal como un estent, por ejemplo, o un polímero cilíndrico insertado en una arteria. Dicho método de administración puede ayudar, por ejemplo, en la prevención o mejora de la reestenosis siguiendo procedimientos tales como

angioplasia con globo. Sin querer limitarse a la teoría, los compuestos de la invención pueden ralentizar o inhibir la migración y proliferación de células de músculo liso en la pared arterial que contribuye a la reestenosis. El compuesto de la invención puede administrarse, por ejemplo, mediante suministro local desde el soporte de un estent, desde de un injerto con estent, desde injertos, o desde la cubierta o vaina de un estent. En algunas realizaciones, un compuesto de la invención se mezcla con una matriz. Dicha matriz puede ser una matriz polimérica, y puede servir para unir el compuesto con el estent. Las matrices poliméricas adecuadas para tal uso incluyen, por ejemplo, poliésteres o copoliésteres basados en lactona, tales como polilactida, policaprolactona glicolida, poliortoésteres, polianhidridos, poliaminoácidos, polisacáridos, polifosfazenos, poli(éter-éster) copolímeros (por ejemplo PEO-PLLA); polidimetilsiloxano, poli(etilen-vinilacetato), polímeros o copolímeros basados en acrilato (por ejemplo polihidroxiethyl metilmetacrilato, polivinilpirrolidona), polímeros fluorados tales como politetrafluoroetileno y ésteres de celulosa. Las matrices adecuadas pueden ser no degradantes o pueden degradarse con el tiempo, liberando el compuesto o los compuestos. El compuesto de la invención puede aplicarse a la superficie del estent mediante diversos métodos, tales como recubrimiento por inmersión/espín, recubrimiento por pulverización, recubrimiento por inmersión y/o recubrimiento con brocha. Los compuestos pueden aplicarse en un disolvente y el disolvente puede dejarse evaporar, formando de este modo una capa de compuestos sobre el estent. Como alternativa, el compuesto puede localizarse en el cuerpo del estent o injerto, por ejemplo, en microcanales o microporos. Cuando se implantan, el compuesto se difunde fuera del cuerpo del estent para ponerse en contacto con la pared arterial. Dichos estents pueden prepararse sumergiendo un estent fabricado que contenga dichos microporos o microcanales en una solución del compuesto de la invención en un disolvente adecuado, seguido de la evaporación del disolvente. El exceso de fármaco sobre la superficie del estent puede retirarse mediante un lavado con disolvente breve adicional. En otras realizaciones adicionales, los compuestos de la invención pueden ligarse mediante enlace covalente a un estent o injerto. Puede usarse un enlazador covalente que se degrade *in vivo*, lo que conduce a la liberación del compuesto de la invención. Puede usarse cualquier enlace bio-lábil para dicho propósito, tal como un enlace éster, amida o anhídrido. El compuesto de la invención puede administrarse adicionalmente por vía intravascular desde un globo usado durante angioplasia. También puede realizarse una administración extravascular de los compuestos a través del pericardio o mediante aplicación adventicia de las formulaciones de la invención para disminuir la reestenosis.

En las siguientes referencias: Patente de Estados Unidos n.º 5451233; Patente de Estados Unidos n.º 5040548; Patente de Estados Unidos n.º 5061273; Patente de Estados Unidos n.º 5496346; Patente de Estados Unidos n.º 5292331; Patente de Estados Unidos n.º 5674278; Patente de Estados Unidos n.º 3657744; Patente de Estados Unidos n.º 4739762; Patente de Estados Unidos n.º 5195984; Patente de Estados Unidos n.º 5292331; Patente de Estados Unidos n.º 5674278; Patente de Estados Unidos n.º 5879382; Patente de Estados Unidos n.º 6344053, se desvelan diversos dispositivos de tipo estent que pueden usarse como se ha descrito.

El compuesto de la invención puede administrarse en dosificaciones. Es conocido en la técnica que debido a la variabilidad entre sujetos en cuanto a la farmacocinética de los compuestos, la individualización del régimen de dosificación es necesaria para una terapia óptima. La dosificación para el compuesto de la invención puede hallarse a través de experimentación acostumbrada a la luz de la presente divulgación.

Cuando el compuesto de la invención se administra en una composición que comprende uno o más agentes, y el agente tiene una semivida más corta que la del compuesto de la invención, las formas de dosificación unitaria del agente y del compuesto de la invención han de ajustarse convenientemente.

La composición farmacéutica objeto puede estar, por ejemplo, en una forma adecuada para administración oral tal como un comprimido, una cápsula, una píldora, polvo, formulaciones, soluciones, suspensiones de liberación sostenida, por inyección parenteral como una solución, suspensión o emulsión estéril, para administración tópica como una pomada o crema o para administración recta como un supositorio. La composición farmacéutica puede estar en formas de dosificación unitaria, adecuadas para la administración sencilla de dosificaciones exactas. La composición farmacéutica incluirá un vehículo o excipiente convencional farmacéutico y un compuesto de acuerdo con la invención como un principio activo. Además, puede incluir otros agentes, vehículos, adyuvantes, etc., medicinales o farmacéuticos.

Las formas de administración parenteral ejemplares incluyen soluciones o suspensiones del compuesto activo en soluciones acuosas estériles, por ejemplo, soluciones de dextrosa o propilenglicol acuosas. Si se desea, dichas formas de dosificación pueden tamponarse adecuadamente.

La invención también proporciona kits. Los kits incluyen un compuesto o compuestos de la presente invención como se describe en el presente documento, en un envase adecuado, y material escrito que puede incluir instrucciones para su uso, análisis de estudios clínicos, listado de efectos secundarios y similares. Dichos kits también pueden incluir información, tal como referencias bibliográficas científicas, prospectos, resultados de ensayos clínicos y/o resúmenes de estos y similares, que indican o establecen las actividades y/o ventajas de la composición y/o que describen la dosificación, administración, efectos secundarios, interacción con fármacos u otra información útil para el profesional sanitario. Dicha información puede basarse en los resultados de diversos estudios, por ejemplo, estudios que utilizan animales experimentales que implican modelos *in vivo* y estudios basados en ensayos clínicos humanos. El kit puede contener adicionalmente otro agente. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente

invención y el agente se proporcionan como composiciones distintas en recipientes distintos dentro del kit. En algunas realizaciones, el compuesto de la presente invención y el agente se proporcionan como una sola composición dentro de un recipiente en el kit. Los artículos de envasado y adicionales adecuados para su uso (por ejemplo, copa medidora para preparaciones líquidas, envoltorio de aluminio para minimizar la exposición al aire y similar) son conocidos en la técnica y pueden estar incluidos en el kit. Los kits descritos en el presente documento pueden proporcionarse, comercializarse y/o facilitarse a profesionales sanitarios, entre los que se incluyen médicos, enfermeros, farmacéuticos, auxiliares de farmacia y similares. En algunas realizaciones los kits también pueden comercializarse directamente al consumidor.

La invención también proporciona el compuesto o las composiciones farmacéuticas de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento de patologías, incluyendo, pero sin limitación, afecciones implicadas por un mal funcionamiento de mTORC1, mTORC2 y/o PI3-quinasas.

La invención también se refiere a un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o una sal, éster, profármaco, solvato, hidrato o derivado de los mismos farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, dicho método se refiere al tratamiento del cáncer tal como leucemia mieloide aguda, cáncer de timo, de cerebro, de pulmón, de células escamosas, de piel, ojo, retinoblastoma, melanoma intraocular, de la cavidad oral y orofaríngeo, de vejiga, gástrico, de estómago, pancreático, de mama, de cuello uterino, de cabeza, de cuello, renal, de hígado, de ovario, de próstata, colorrectal, esofágico, testicular, ginecológico, tiroideo, cáncer relacionado con el SNC, SNP y SIDA (por ejemplo, Linfoma y Sarcoma de Kaposi), o cáncer inducido por virus.

Los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención.

La invención también se refiere a un compuesto para su uso en un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con vasculogénesis o angiogénesis en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal, éster, profármaco, solvato, hidrato o derivado de los mismos farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, dicho método es para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en angiogénesis tumoral, hemangioma, glioma, melanoma, sarcoma de Kaposi y cáncer de ovario, de mama, de pulmón, pancreático, de próstata, de colon y epidermoide.

Los sujetos que pueden tratarse con los compuestos de la invención, o sal, éster, solvato, hidrato o derivado de dichos compuestos farmacéuticamente aceptables, de acuerdo con los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, sujetos a los que se les ha diagnosticado HBP (Hiperplasia benigna de próstata); cáncer de mama, tal como carcinoma ductal en tejido ductal en una glándula mamaria, carcinomas medulares, carcinomas coloideos, carcinomas tubulares y cáncer de mama inflamatorio; cáncer de ovario, incluyendo tumores de ovario epitelial tal como adenocarcinoma en el ovario y un adenocarcinoma que ha migrado desde el ovario a la cavidad abdominal; cáncer uterino; cáncer de cuello uterino tal como adenocarcinoma en el epitelio del cuello uterino incluyendo carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas; cáncer de próstata, tal como cáncer de próstata seleccionado de lo siguiente: un adenocarcinoma o un adenocarcinoma que ha migrado a los huesos; cáncer pancreático tal como carcinoma epitelial en el tejido del conducto pancreático y un adenocarcinoma en un conducto pancreático; cáncer de vejiga, tal como un carcinoma de células transicionales en la vejiga urinaria; carcinomas uroteliales (cánceres microcíticos de células transicionales); leucemia, tal como leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica aguda; leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, tricoleucemia, mielodisplasia, trastornos mieloproliferativos, leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), mastocitosis, leucemia linfocítica crónica (LLC), mieloma múltiple (MM) y síndrome mielodisplásico (SMD); cáncer de hueso; cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que se divide en carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas y carcinomas indiferenciados de células grandes, y cáncer de pulmón microcítico; cáncer de piel tal como carcinoma de células basales, melanoma, carcinoma de células escamosas y queratosis actínica, que es una afección cutánea que algunas veces se desarrolla en carcinoma de células escamosas; retinoblastoma ocular; melanoma cutáneo o intraocular (ojo); cáncer primario de hígado (cáncer que comienza en el hígado); cáncer de riñón, cáncer tiroideo tal como papilar, folicular, medular y anaplásico; linfoma relacionado con SIDA tal como linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma inmunoblástico de linfocitos B y linfoma de células pequeñas no escindidas; Sarcoma de Kaposi; cánceres inducidos por virus, incluyendo virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), y carcinoma hepatocelular; virus linfotrófico humano de tipo 1 (VLTH-1) y leucemia/linfoma de linfocitos T en adultos; y virus de papiloma humano (VPH) y cáncer de cuello uterino; cánceres del sistema nervioso central (SNC), tal como tumor cerebral primario, que incluye gliomas (astrocitoma, astrocitoma anaplásico, o glioblastoma multiforme), Oligodendroglioma, Ependimoma, Meningioma, Linfoma, Schwannoma y Meduloblastoma; cánceres del sistema nervioso periférico (SNP) tales como neuromas acústicos y tumor maligno de la vaina nerviosa periférica (TMVNP) incluyendo neurofibromas y schwannomas, citoma fibroso maligno, histiocitoma fibroso maligno, meningioma maligno, mesotelioma maligno y tumor Mülleriano mixto maligno, cáncer de cavidad oral y orofaríngeo tal como cáncer hipofaríngeo, cáncer laríngeo, cáncer nasofaríngeo y cáncer orofaríngeo; cáncer de estómago tal como linfomas, tumores estromales gástricos y tumores carcinoides; cáncer testicular tal como tumores de células

germinales (TCG), que incluye seminomas y no seminomas y tumores estromales gonadales que incluyen tumores de células de Leydig y tumores de células de Sertoli; cáncer de timo tal como timoma, carcinomas tímicos, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin o tumores carcinoides; cáncer rectal; y cáncer de colon.

- 5 La invención también se refiere a un compuesto para su uso en un método de tratamiento de diabetes en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal, éster, solvato, hidrato o derivado de los mismos, farmacéuticamente aceptable.

- 10 En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de enfermedades oftálmicas, administrando en el ojo de un sujeto, uno o más compuestos de la invención o composiciones farmacéuticas.

- 15 Adicionalmente se proporcionan métodos para la administración de los compuestos de la presente invención mediante gotas intraoculares, inyección intraocular, inyección intravítrea, por vía tópica o usando un dispositivo que eluye un fármaco, una microcápsula, un implante o un dispositivo de microfluidos. En algunos casos, los compuestos de la presente invención se administran con un vehículo o excipiente que aumenta la penetración intraocular del compuesto, tal como una emulsión de aceite y agua con partículas coloidales que tienen un núcleo oleaginoso rodeado de una película interfacial. Se contempla que en el ojo puedan usarse todas las vías locales, incluyendo la administración tópica, subconjuntiva, periocular, retrobulbar, subtenoniana, intracámara, intravítrea, intraocular, subretinal, yuxtapalpebral y supracoroidal. La administración sistémica o parenteral puede ser factible incluyendo, pero sin limitación, el suministro intravenoso, subcutáneo y oral. Un método de administración ejemplar será por inyección intravítrea o subtenoniana de soluciones o suspensiones, o la colocación intravítrea o subtenoniana de dispositivos bioerosionables o no bioerosionables, o mediante administración ocular tópica de soluciones o suspensiones o administración yuxtaescleral posterior de una formulación en gel o en crema.

- 25 En algunos casos, las partículas coloidales incluyen al menos un agente catiónico y al menos un tensioactivo no iónico tal como poloxamer, tiloxapol, un polisorbato, un derivado de aceite de ricino polioxiétilenado, un éster de sorbitan o un estearato de polioxilo. En algunos casos el agente catiónico es una alquilamina, una alquilamina terciaria, un compuesto de amonio cuaternario, un lípido catiónico, un alcohol amino, una sal de biguanidina, un compuesto catiónico o una mezcla de los mismos. En algunos casos el agente catiónico es una sal de biguanidina tal como clorhexidina, poliaminopropil biguanidina, fenformina, alquilbiguanidina, o una mezcla de las mismas. En algunos casos, el compuesto de amonio cuaternario es haluro de benzalconio, haluro de lauralconio, cetrimida, haluro de hexadeciltrimetilamonio, haluro de tetradeciltrimetilamonio, haluro de dodeciltrimetilamonio, haluro de cetrimonio, haluro de bencetonio, haluro de behenalconio, haluro de cetalconio, haluro de cetehildimonio, haluro de cetilpiridinio, haluro de benzododecinio, haluro de cloril metenamina, haluro de miristilalconio, haluro de esterealconio, o una mezcla de dos o más de los mismos. En algunos casos, el agente catiónico es cloruro de benzalconio, cloruro de lauralconio, bromuro de benzododecinio, cloruro de benzetenio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio o una mezcla de dos o más de los mismos. En algunos casos, la fase oleaginososa es aceite mineral y aceite mineral ligero, triglicéridos de cadena media (TCM), aceite de cacahuete; aceites hidrogenados que comprenden aceite de semilla de algodón hidrogenado, aceite de palma hidrogenado, aceite de ricino hidrogenado o aceite de semilla de soja hidrogenado; derivados de aceite de ricino de polioxiétileno hidrogenado que comprenden aceite de ricino polioxil-40 hidrogenado, aceite de ricino polioxil-60 hidrogenado o aceite de ricino polioxil-100 hidrogenado.

- 45 También se desvelan métodos de modulación de una actividad de PI3K y/o mTor quinasa poniendo en contacto la quinasa con una cantidad eficaz del compuesto de la invención. La modulación puede inhibir o activar la actividad quinasa. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad quinasa poniendo en contacto la quinasa con una cantidad eficaz del compuesto de la invención en solución. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de inhibición de la actividad quinasa poniendo en contacto una célula, tejido u órgano que expresa la quinasa de interés. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad quinasa en un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, roedores y mamíferos (por ejemplo, un ser humano) administrando al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición supera el 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

- 55 En algunas realizaciones, la quinasa se selecciona del grupo que consiste en mTor, incluyendo diferentes isoformas tales como mTORC1 y mTORC2; quinasa PI3, incluyendo diferentes isoformas tales como PI3 quinasa  $\alpha$ , PI3 quinasa  $\beta$ , PI3 quinasa  $\gamma$ , PI3 quinasa  $\delta$ ; ADN-PK; Abl, VEGFR, receptor B4 de Efrina (EfrB4); tirosina quinasa receptora TEK (TIE2); tirosina quinasa 3 relacionada con FMS (FLT-3); receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); RET; ATM; ATR; hSmg-1; Hck; Src; receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); KIT; Receptor de Insulina (RI) e IGFR.

- 65 También se desvelan métodos de modulación de la actividad de mTOR poniendo en contacto mTOR con una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para modular la actividad de mTOR. La modulación puede inhibir o activar la actividad de mTOR. También se desvelan métodos de inhibición de mTOR poniendo en contacto mTOR con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad mTOR. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en una solución poniendo en contacto dicha solución con

una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicha solución. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en una célula poniendo en contacto dicha célula con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicha célula. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en un tejido poniendo en contacto dicho tejido con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicho tejido. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en un organismo poniendo en contacto dicho organismo con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicho organismo. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en un animal poniendo en contacto dicho animal con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicho animal. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en un mamífero poniendo en contacto dicho mamífero con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicho mamífero. También se desvelan métodos de inhibición de la actividad de mTOR en un ser humano poniendo en contacto dicho ser humano con una cantidad del compuesto de la invención suficiente para inhibir la actividad de mTOR en dicho ser humano. La presente invención proporciona un compuesto para su uso en los métodos de tratamiento de una enfermedad mediada por la actividad de mTOR en un sujeto que necesite dicho tratamiento.

También se desvelan métodos para terapias de combinación en las que un agente que se sabe que modula otras rutas, u otros componentes de la misma ruta, o incluso etapas solapantes de enzimas diana, se usan en combinación con un compuesto de la presente invención, o una sal, éster, solvato, hidrato o derivado de los mismos farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, dicha terapia incluye, pero sin limitación, la combinación de uno o más compuestos de la invención con agentes quimioterapéuticos, anticuerpos terapéuticos y radioterapia para proporcionar un efecto terapéutico sinérgico o aditivo.

En un aspecto, los compuestos o composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentar eficacia sinérgica o aditiva cuando se administran en combinación con agentes que inhiben la producción o actividad de IgE. Dicha combinación puede reducir el efecto indeseado de altos niveles de IgE asociados con el uso de uno o más inhibidores de PI3K $\delta$ , si se produce dicho efecto. Esto puede ser particularmente útil en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (EAI) tales como artritis reumatoide. Adicionalmente, la administración de inhibidores de PI3K $\delta$  o PI3K $\delta/\gamma$  de la invención en combinación con inhibidores de mTOR pueden exhibir también sinergia a través de la inhibición potenciada de la ruta PI3K.

El compuesto de la invención puede formularse o administrarse junto con otros agentes que actúan mitigando los síntomas de afecciones inflamatorias tales como encefalomielitis, asma, y las otras enfermedades descritas en el presente documento. Estos agentes incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), por ejemplo, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno; naproxeno; indometacina; nabumetona; tolmetina; etc. Los corticosteroides se usan para reducir la inflamación y suprimir la actividad del sistema inmunitario. El fármaco más habitualmente prescrito de este tipo es la Prednisona. También pueden ser útiles la cloroquina (Aralen) o la hidroxicloroquina (Plaquenil) en algunos individuos con lupus. Estos son los más habitualmente prescritos para los síntomas del lupus relacionados con la piel y con las articulaciones. La azatioprina (Imuran) y la ciclofosfamida (Cytosan) suprimen la inflamación y tienden a suprimir el sistema inmunitario. Otros agentes, por ejemplo, metotrexato y ciclosporina se usan para controlar los síntomas del lupus. Los anticoagulantes se emplean para impedir que la sangre se coagule rápidamente. Estos varían desde aspirina a una dosis muy baja que impide la adhesión plaquetaria, a heparina/coumadina.

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a un compuesto y a composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para inhibir el crecimiento anómalo de las células en un mamífero, que comprende una cantidad de un compuesto de la invención, o una sal, solvato o hidrato del mismo, farmacéuticamente aceptable en combinación con una cantidad de un agente antineoplásico (por ejemplo, un agente quimioterapéutico). Actualmente en la técnica se conocen muchos agentes quimioterapéuticos que pueden usarse en combinación con el compuesto de la invención.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasa, modificadores de respuestas biológicas, antihormonas, inhibidores de la angiogénesis y antiandrógenos.

Son ejemplos no limitantes agentes quimioterapéuticos, agentes citotóxicos y moléculas pequeñas no peptídicas tales como Gleevec® (Mesilato de Imatinib), Velcade® (bortezomib), Casodex (bicalutamida), Iressa® (gefitinib), y Adriamicina, así como una multitud de agentes quimioterapéuticos. Son ejemplos no limitantes agentes quimioterapéuticos que incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaninas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, fosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina,

Casodex™, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encicitabina, floxuridina, andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida glicosida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidamina; mitoguzona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK.R™; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretan; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; pipobroman; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Onaology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables. También incluidos como acondicionadores celulares quimioterapéuticos adecuados son los agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (Nolvadex™), raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromataza, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; camptotecina-11 (CPT-11); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO). Cuando se desee, los compuestos, o composición farmacéutica de la presente invención, pueden usarse en combinación con fármacos antineoplásicos normalmente prescritos tales como Herceptin®, Avastin®, Erbitux®, Rituxan®, Taxol®, Arimidex®, Taxotere®, ABVD, AVICINE, Abagovomab, Acrídín carboxamida, Adecatumumab, 17-N-Alilamino-17-demetoxigeldanamicina, Alfaradín, Alvocidib, 3-Aminopiridín-2-carboxaldehído tiosemicarbazona, Amonafida, Antracenediona, inmunotoxinas anti-CD22, antineoplásicos, hierbas antitumorogénicas, Apaziquona, Atiprimod, Azatioprina, Belotecan, Bendamustina, BIBW 2992, Biricodar, Brostalicina, Briostatina, Butionin sulfoximina, CBV (quimioterapia), Caliculina, agentes antineoplásicos no específicos del ciclo celular, ácido dicloroacético, Discodermólido, Elsamitrucina, Encicitabina, Epotilona, Eribulin, Everolimus, Exatecan, Exisulind, Ferruginol, Forodesina, Fosfestrol, régimen de quimioterapia ICE, IT-101, Imexón, Imiquimod, Indolocarbazol, Irofulven, Laniquidar, Larotaxel, Lenalidomida, Lucantona, Lurtotecan, Mafosfamida, Mitozolomida, Nafoxidina, Nedaplatino, Olaparib, Ortataxel, PAC-1, papaya, Pixantrona, inhibidor de Proteasoma, Rebecamicina, Resiquimod, Rubitecan, SN-38, Salinosporamida A, Sapacitabina, Stanford V, Swainsonina, Talaporfina, Tariquidar, Tegafur-uracilo, Temodar, Tesetaxel, tetranitrato de Triplatino, Tris(2-cloroetil)amina, Troxacitabina, Uramustina, Vadimezan, Vinflunina, ZD6126 y Zosuquidar.

También se describe un método para el uso de los compuestos o composiciones farmacéuticas proporcionados en el presente documento, en combinación con radioterapia, para inhibir el crecimiento anómalo de las células o tratar el trastorno hiperproliferativo en el mamífero. Las técnicas para administrar la radioterapia son muy conocidas en la materia y estas técnicas pueden usarse en terapias de combinación descritas en el presente documento. La administración del compuesto de la presente invención en esta terapia de combinación puede determinarse como se describe en el presente documento.

La radioterapia puede administrarse a través de uno de los diversos métodos, o una combinación de métodos, incluyendo sin limitación, terapia de haz externo, radioterapia interna, radiación por implante, radiocirugía estereotáctica, radioterapia sistémica, radioterapia y braquiterapia intersticial permanente o temporal. El término "braquiterapia", como se usa en el presente documento, se refiere a radioterapia suministrada mediante un material radioactivo espacialmente confinado insertado en el organismo en, o cerca de, un tumor u otro sitio enfermo en un tejido proliferativo. El término pretende incluir, sin limitación, la exposición a isótopos radioactivos (por ejemplo, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, y a isótopos radioactivos de Lu). Las fuentes de radiación adecuadas para su uso como un acondicionador celular de la presente invención incluyen tanto sólidos como líquidos. Como ejemplo no limitante, la fuente de radiación puede ser un radionúclido, tal como I-125, I-131, Yb-169, Ir-192 como una fuente sólida, I-125 como una fuente sólida u otros radionúclidos que emiten fotones, partículas beta, radiación gamma, u otros rayos terapéuticos. El material radioactivo también puede ser un fluido hecho de cualquier solución de uno o más radionúclidos, por ejemplo, una solución de I-125 o I-131, o un fluido radioactivo puede producirse usando una suspensión de un fluido adecuado que contenga partículas pequeñas de radionúclidos sólidos, tales como Au-198, Y-90. Además, el radionúclido (o radionúclidos) puede representarse en un gel o microesferas radioactivas.

Sin limitarse a ninguna teoría, el compuesto de la presente invención puede hacer que las células anómalas sean más sensibles a la radioterapia con el fin de destruir y/o inhibir el crecimiento de dichas células. Por consiguiente, también se desvela un método para sensibilizar células anómalas en un mamífero al tratamiento con radiación que

comprende administrar al mamífero una cantidad de un compuesto de la presente invención o una sal, éster, solvato, hidrato o derivados de los mismos farmacéuticamente aceptables, cuya cantidad sea eficaz en la sensibilización de las células anómalas al tratamiento con radiación. La cantidad del compuesto, sal o solvato en este método puede determinarse de acuerdo con los medios para determinar cantidades eficaces de dichos compuestos descritos en el presente documento.

El compuesto o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse en combinación con una cantidad de una o más sustancias seleccionadas de agentes anti-angiogénesis, inhibidores de transducción de señales, agentes antiproliferativos, inhibidores de glucólisis o inhibidores de autofagia.

Pueden usarse agentes anti-angiogénesis, tales como inhibidores de MMP-2 (metaloproteínasa 2 de la matriz), inhibidores de MMP-9 (metaloproteínasa 9 de la matriz) e inhibidores de COX-11 (ciclooxigenasa 11), junto con un compuesto de la invención y composiciones farmacéuticas descritos en el presente documento. Los agentes anti-angiogénesis incluyen, por ejemplo, rapamicina, temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), sorafenib, sunitinib, y bevacizumab. Como ejemplos útiles de inhibidores de COX-II se incluyen CELEBREX™ (alecoxib), valdecoxib y rofecoxib. Ejemplos de inhibidores de metaloproteínasa de la matriz se describen en el documento WO 96/33172 (publicado el 24 de octubre de 1996), en el documento WO 96/27583 (publicado el 7 de marzo de 1996), en la Solicitud de Patente Europea n.º 97304971.1 (presentada el 8 de julio de 1997), en la Solicitud de Patente Europea n.º 99308617.2 (presentada el 29 de octubre de 1999), en el documento WO 98/07697 (publicado el 26 de febrero de 1998), en el documento WO 98/03516 (publicado el 29 de enero de 1998), en el documento WO 98/34918 (publicado el 13 de agosto de 1998), en el documento WO 98/34915 (publicado el 13 de agosto de 1998), en el documento WO 98/33768 (publicado el 6 de agosto de 1998), en el documento WO 98/30566 (publicado el 16 de julio de 1998), en la Publicación de Patente Europea 606.046 (publicada el 13 de julio de 1994), en la Publicación de Patente Europea 931.788 (publicada el 28 de julio de 1999), en el documento WO 90/05719 (publicado el 31 de mayo de 1990), en el documento WO 99/52910 (publicado el 21 de octubre de 1999), en el documento WO 99/52889 (publicado el 21 de octubre de 1999), en el documento WO 99/29667 (publicado el 17 de junio de 1999), en la solicitud Internacional PCT n.º PCT/IB98/01113 (presentada el 21 de julio de 1998), en la solicitud de Patente Europea n.º 99302232.1 (presentada el 25 de marzo de 1999), en la solicitud de Patente de Gran Bretaña n.º 9912961.1 (presentada el 3 de junio de 1999), en la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º 60/148.464 (presentada el 12 de agosto de 1999), en la Patente de Estados Unidos 5.863.949 (expedida el 26 de enero de 1999), en la Patente de Estados Unidos 5.861.510 (expedida el 19 de enero de 1999) y en la Publicación de Patente Europea 780.386 (publicada el 25 de junio de 1997). Los inhibidores de MMP-2 y MMP-9 preferidos son aquellos que tienen muy poca actividad o ninguna inhibiendo la MMP-1. Más preferidos son los que inhiben selectivamente la MMP-2 y/o AMP-9 con respecto a otras metaloproteínasas de la matriz (es decir, MAP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13). Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP útiles en la invención son AG-3340, RO 32-3555 y RS 13-0830.

Como inhibidores de autofagia se incluyen, pero sin limitación, cloroquina, 3-metiladenina, hidroxiclороquina (Plaquenil™), bafilomicina A1, 5-amino-4-imidazol carboxamida ribósido (AICAR), ácido okadaico, toxinas de algas supresoras de autofagia que inhiben fosfatasa proteicas de tipo 2A o de tipo 1, análogos de AMPc y fármacos que elevan los niveles de AMPc, tales como adenosina, LY204002, N6-mercaptopurina ribósido y vinblastina. Adicionalmente también puede usarse ARNip o antisentido que inhibe la expresión de proteínas, incluyendo pero sin limitación ATG5 (que intervienen en la autofagia).

Los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse o administrarse junto con barreras de tejido líquido o sólido, también conocidas como lubricantes. Los ejemplos de barreras de tejidos incluyen, pero sin limitación, polisacáridos, poliglucanos, seprafilin, interceed y ácido hialurónico.

Los medicamentos que pueden administrarse junto con los compuestos descritos en el presente documento, incluyen cualquiera de los fármacos adecuados normalmente suministrados por inhalación, por ejemplo, analgésicos, por ejemplo, codeína, dihidromorfina, ergotamina, fentanilo o morfina; preparaciones anginosas, por ejemplo, diltiazem; antialérgicos, por ejemplo, cromoglicato, ketotifeno o nedocromil; antiinfecciosos, por ejemplo cefalosporinas, penicilinas, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclinas o pentamidina; antihistaminas, por ejemplo, metapirileno; antiinflamatorios, por ejemplo, beclometasona, flunisolida, budesonida, tipredano, triamcinolona de acetona o fluticasona; antitusivos, por ejemplo, noscapina; broncodilatadores, por ejemplo, efedrina, adrenalina, fenoterol, formoterol, isoprenalina, metaproterenol, fenilefrina, fenilpropanolamina, pirbuterol, reproterol, rimiterol, salbutamol, salmeterol, terbutalin, isometarol, tulobuterol, orciprenalina o (-)-4-amino-3,5-dicloro- $\alpha$ -[[[6-[2-(2-piridinil)etoxi]hexil]-amino]metil]benzenemetanol; diuréticos, por ejemplo, amilorida; anticolinérgicos por ejemplo, ipratropio, atropina u oxitropio; hormonas, por ejemplo, cortisona, hidrocortisona o prednisolona; xantinas por ejemplo aminofilina, teofilinato de colina, teofilinato de lisina o teofilina; y proteínas y péptidos terapéuticos, por ejemplo, insulina o glucagón. Será obvio para un experto en la técnica que, cuando sea apropiado, los medicamentos pueden usarse en forma de sales (por ejemplo, como sales amina o metales alcalinos o como sales de adición de ácido) o como ésteres (por ejemplo, ésteres de alquilo inferior) o como solvatos (por ejemplo, hidratos) para optimizar la actividad y/o estabilidad del medicamento.

Otros agentes terapéuticos ejemplares útiles para una terapia de combinación incluyen, pero sin limitación, agentes

como los que se han descrito anteriormente, radioterapia, antagonistas de hormonas, hormonas y sus factores de liberación, fármacos tiroideos y antitiroideos, estrógenos y progestinas, andrógenos, hormona adrenocorticotrópica; esteroides adrenocorticales y sus análogos sintéticos; inhibidores de la síntesis y acciones de hormonas adrenocorticales, insulina, agentes hipoglucémicos orales, y la farmacología del páncreas endocrino, agentes que afectan a la calcificación y renovación ósea: calcio, fosfato, hormona paratiroidea, vitamina D, calcitonina, vitaminas tales como vitaminas solubles en agua, complejo de vitamina B, ácido ascórbico, vitaminas solubles en grasas, vitaminas A, K y E, factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, agonistas y antagonistas de receptores muscarínicos; agentes anticolinesterasa; agentes que actúan en la conexión neuromuscular y/o ganglios autónomos; catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y agonistas o antagonistas de receptores adrenérgicos; y agonistas y antagonistas de receptores de 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina).

Los agentes terapéuticos también pueden incluir agentes para el dolor e inflamación, tales como histamina y antagonistas de histamina, bradiquinina y antagonistas de bradiquinina, 5-hidroxitriptamina (serotonina), sustancias lipídicas que se generan por biotransformación de los productos de la hidrólisis selectiva de fosfolípidos de membrana, eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, aspirina, agentes antiinflamatorios no esteroideos, agentes analgésicos - antipiréticos, agentes que inhiben la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa inducible, inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 inducible, autacoides, hormonas paracrinas, somatostatina, gastrina, citocinas que actúan como mediadoras en interacciones implicadas en respuestas inmunitarias humorales y celulares, autacoides derivados de lípidos, eicosanoides, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, ipratropio, glucocorticoides, metilxantinas, bloqueadores del canal de sodio, agonistas de receptores opioides, bloqueadores del canal de calcio, estabilizadores de la membrana e inhibidores de leucotrienos.

Los agentes terapéuticos adicionales contemplados en el presente documento incluyen diuréticos, vasopresina, agentes que afectan a la conservación renal del agua, renina, angiotensina, agentes útiles en el tratamiento de isquemia miocárdica, agentes anti-hipertensivos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas del receptor  $\beta$ -adrenérgico, agentes para el tratamiento de hipercolesterolemia, y agentes para el tratamiento de dislipidemia.

Otros agentes terapéuticos contemplados incluyen fármacos que se utilizan para el control de la acidez gástrica, agentes para el tratamiento de úlceras pépticas, agentes para el tratamiento de enfermedad de reflujo gastroesofágico, agentes procinéticos, antieméticos, agentes que se utilizan en el síndrome del intestino irritable, agentes que se utilizan para la diarrea, para el estreñimiento, para la enfermedad inflamatoria intestinal, para enfermedades biliares y para enfermedades pancreáticas. Agentes terapéuticos que se utilizan para el tratamiento de infecciones protozoarias, fármacos que se utilizan para el tratamiento de la Malaria, Amebiasis, Giardiasis, Tricomoniasis, Tripanosomiasis y/o Leishmaniosis y/o fármacos que se utilizan en la quimioterapia de helmintiasis. Otros agentes terapéuticos incluyen agentes antimicrobianos, sulfonamidas, trimetoprio-sulfametoxazol quinolonas, y agentes para infecciones del tracto urinario, penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos, un agente que comprende un aminoglucósido, inhibidores de la síntesis de proteínas, fármacos que se utilizan en la quimioterapia de tuberculosis, enfermedades causadas por el complejo *Mycobacterium avium* y lepra, agentes antifúngicos, agentes antivíricos, incluyendo agentes no retrovíricos y agentes antirretrovíricos.

Los ejemplos de anticuerpos terapéuticos que pueden combinarse con un compuesto de la invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra tirosina quinasas receptoras (cetuximab, panitumumab, trastuzumab), anticuerpos contra-CD20 (rituximab, tositumomab) y otros anticuerpos tales como alemtuzumab, bevacizumab y gemtuzumab.

Por otra parte, en los métodos del presente documento, se contemplan agentes terapéuticos que se utilizan para la inmunomodulación, tales como agentes inmunomoduladores, inmunosupresores, tolerógenos e inmunoestimulantes. También se contemplan agentes terapéuticos que actúan sobre la sangre y sobre los órganos formadores de la sangre, agentes hematopoyéticos, factores de crecimiento, minerales y vitaminas, fármacos anticoagulantes, trombolíticos y antiplaquetarios.

Para el tratamiento de carcinoma renal, un compuesto de la presente invención, incluyendo pero sin limitación el compuesto 1 de la Tabla 1, puede combinarse con sorafenib y/o avastin. Para el tratamiento de un trastorno endometrial, un compuesto de la presente invención, incluyendo pero sin limitación el compuesto 1 de la Tabla 1, puede combinarse con doxorubicina, taxotere (taxol) y/o cisplatino (carboplatino). Para el tratamiento de cáncer de ovario, un compuesto de la presente invención, incluyendo pero sin limitación el compuesto 1 de la Tabla 1, puede combinarse con cisplatino (carboplatino), taxotere, doxorubicina, topotecán y/o tamoxifeno. Para el tratamiento de cáncer de mama, un compuesto de la presente invención, incluyendo pero sin limitación el compuesto 1 de la Tabla 1, puede combinarse con taxotere (taxol), gemcitabina (capecitabina), tamoxifeno, letrozol, tarceva, lapatinib, PD0325901, avastin, herceptina, OSI-906 y/u OSI-930. Para el tratamiento de cáncer de pulmón, un compuesto de la presente invención, incluyendo pero sin limitación el compuesto 1 de la Tabla 1, puede combinarse con taxotere (taxol), gemcitabina, cisplatino, perimetrexed, Tarceva, PD0325901 y/o avastin.

Otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con un compuesto de la invención pueden encontrarse en Goodman y Gilman's "The Pharmacological Basis of Therapeutics" décima edición de Hardman, Limbird y Gilman o the Physician's Desk Reference, ambas referencias incorporadas en el presente documento por referencia en su

totalidad.

Los compuestos descritos en el presente documento que pueden usarse en combinación con los agentes desvelados en el presente documento u otros agentes adecuados, dependen de la afección que vaya a tratarse. Por lo tanto, en algunas realizaciones uno o más compuestos de la invención se co-administrarán con otros agentes como los descritos anteriormente. Cuando se usan en terapia de combinación, los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse con el segundo agente simultánea o individualmente. Esta administración en combinación puede incluir la administración simultánea de los dos agentes en la misma forma de dosificación, administración simultánea en formas de dosificación individuales, y administración individual. Es decir, un compuesto descrito en el presente documento y cualquiera de los agentes descritos anteriormente pueden formularse conjuntamente en la misma forma de dosificación y administrarse simultáneamente. Como alternativa, un compuesto de la invención y cualquiera de los agentes descritos anteriormente pueden administrarse simultáneamente, en el que ambos agentes están presentes en formulaciones distintas. En otra alternativa, un compuesto de la presente invención puede administrarse justo después de cualquiera de los agentes descritos anteriormente, o viceversa. En un protocolo de administración individual, un compuesto de la invención, y cualquiera de los agentes descritos anteriormente, pueden administrarse con algunos minutos de diferencia, o con algunas horas de diferencia o con algunos días de diferencia.

La administración del compuesto de la presente invención puede efectuarse mediante cualquier método que permita el suministro de los compuestos en el lugar de la acción. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención puede administrarse en dosis sencillas o múltiples mediante cualquiera de los modos de administración aceptados de agentes que tienen utilidades similares, incluyendo las vías rectal, bucal, intranasal y transdérmica, mediante inyección intraarterial, intravenosa, intraperitoneal, parenteral, intramuscular, subcutánea, oral, tópica, como un inhalante o mediante un dispositivo impregnado o recubierto tal como un estent, por ejemplo, o como un polímero cilíndrico insertado en una arteria.

La cantidad del compuesto administrado dependerá del mamífero que vaya a tratarse, de la gravedad del trastorno o de la afección, de la tasa de administración, de la disposición del compuesto y del criterio del médico que la prescribe. Sin embargo, una dosificación eficaz está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal al día, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis sencillas o divididas. Para un ser humano de 70 kg, esta cantidad sería de aproximadamente 0,05 a 7 g/día, preferentemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente indicado puede ser más que adecuado, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis incluso más grandes sin causar ningún efecto secundario adverso, por ejemplo, dividiendo dichas dosis más grandes en varias dosis más pequeñas para la administración a lo largo del día.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra en una sola dosis. Típicamente, dicha administración será por inyección, por ejemplo, inyección intravenosa, para introducir el agente rápidamente. Sin embargo, según sea apropiado, pueden usarse otras vías. También puede usarse una sola dosis de un compuesto de la invención para el tratamiento de una afección aguda.

En algunas realizaciones, el compuesto de la invención se administra en dosis múltiples. La dosificación puede ser de aproximadamente una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces, seis veces o más de seis veces al día. La dosificación puede ser de aproximadamente una vez al mes, una vez cada dos semanas, una vez a la semana, o una vez cada dos días. En otra realización un compuesto de la invención y otro agente se administran conjuntamente de aproximadamente una vez al día a aproximadamente 6 veces al día. En otra realización la administración de un compuesto de la invención y un agente continúa durante menos de aproximadamente 7 días. En otra realización adicional, la administración continúa durante más de aproximadamente 6, 10, 14, 28 días, dos meses, seis meses o un año. En algunos casos, la dosificación continua se realiza y se mantiene en tanto en cuanto sea necesaria.

La administración de los agentes de la invención puede continuar en tanto en cuanto sea necesaria. En algunas realizaciones, un agente de la invención se administra durante más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 o 28 días. En algunas realizaciones, un agente de la invención se administra durante menos de 28, 14, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día. En algunas realizaciones, un agente de la invención se administra crónicamente sobre una base en curso, por ejemplo, para el tratamiento de efectos crónicos

Cuando el compuesto de la invención se administra en una composición que comprende uno o más agentes, y el agente tiene una semivida más corta que la del compuesto de la invención, las formas de dosificación unitaria del agente y del compuesto de la invención pueden ajustarse convenientemente.

Los ejemplos y preparaciones proporcionados a continuación ilustran adicionalmente y son ejemplos del compuesto de la presente invención y de métodos de preparación de este y compuestos similares. Debe entenderse que el ámbito de la presente invención no está limitado de ningún modo por alcance de los siguientes ejemplos y preparaciones. En los siguientes ejemplos las moléculas con un solo centro quiral, a menos que se indique de otra manera, existen como una mezcla racémica. Las moléculas con dos o más centros quirales, a menos que se indique

otra cosa, existen como una mezcla racémica de diastereómeros. Pueden obtenerse enantiómeros/diastereómeros sencillos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia.

Los siguientes ejemplos, no se encuentran dentro del ámbito de las reivindicaciones, son ejemplos de referencia.

5

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Expresión y ensayos de inhibición de p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$ , p110 $\beta$ /p85 $\alpha$ , p110 $\delta$ /p85 $\alpha$ y p110 $\gamma$

10 Las PI3-K de clase I pueden adquirirse (p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$ , p110 $\beta$ /p85 $\alpha$ , p110 $\delta$ /p85 $\alpha$  en Upstate y p110 $\gamma$  en Sigma) o expresarse como se ha descrito anteriormente (Knight et al., 2004). Los valores de  $CI_{50}$  se miden usando cualquiera de un ensayo de cromatografía en capa fina (TLC) convencional para determinar la actividad lípido quinasa (descrita más adelante) o un ensayo de captura en membrana de alto rendimiento. Las reacciones quinasa se realizan preparando una mezcla de reacción que contengan quinasa, inhibidor (concentración final de DMSO al 2 %), tampón  
15 (HEPES 25 nM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) y fosfatidilinositol tratado con ultrasonido reciente (100  $\mu$ g/ml). Las reacciones comienzan con la adición de ATP que contiene 10  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -32P-ATP a una concentración final de 10 o 100  $\mu$ M y dejando continuar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para el análisis TLC, las reacciones finalizan después mediante la adición de 105  $\mu$ l de HCl 1 N seguido de 160  $\mu$ l de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:1). La mezcla bifásica se agita en agitador vorticial, se centrifuga brevemente y la fase orgánica se transfiere a un nuevo tubo usando una  
20 punta de pipeta de carga de gel previamente cubierta con CHCl<sub>3</sub>. Este extracto se aplica sobre las placas TLC y se revela durante 3-4 horas en una solución 65:35 de *n*-propanol:ácido acético 1 M. Las placas TLC se secan después, se exponen a un detector de imagen fotoestimulable (Storm, Amersham) y se cuantifican. Para cada compuesto, la actividad quinasa se mide a concentraciones de inhibidor 10-12 que representan diluciones con factor dos de la concentración más alta ensayada (típicamente, 200  $\mu$ M). Para los compuestos que muestran una actividad  
25 significativa, las determinaciones  $CI_{50}$  se repiten de dos a cuatro veces, y el valor indicado es el promedio de estas mediciones independientes.

Se dispone de otros kits o sistemas comerciales para realizar ensayos de actividades PI3-K. Los kits o sistemas disponibles en el comercio pueden usarse para explorar inhibidores y/o agonistas de PI3-K incluyendo, pero sin limitación, PI 3-quinasa  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ . Un sistema ejemplar es el ensayo HTRF™ de PI 3-quinasa (humana) de Upstate. El ensayo puede realizarse de acuerdo con los procedimientos sugeridos por el fabricante. En resumen, el ensayo es un ensayo FRET resuelto en tiempo que mide indirectamente el producto PIP3 formado por la actividad de una PI3-K. La reacción quinasa se realiza en una placa de microtitulación (por ejemplo, una placa de microtitulación de 384 pocillos). El volumen de reacción total es de aproximadamente 20  $\mu$ l por pocillo. En la primera etapa, cada pocillo recibe 2  $\mu$ l del compuesto de ensayo en dimetilsulfóxido al 20 % dando como resultado una concentración final de DMSO del 2 %. A continuación, se añaden aproximadamente 14,5  $\mu$ l de una mezcla quinasa/PIP2 (diluida en tampón de reacción 1X) por pocillo para dar una concentración final de 0,25-0,3  $\mu$ g/ml de quinasa y de 10  $\mu$ M de PIP2. La placa se sella y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para iniciar la reacción, se añaden 3,5  $\mu$ l de ATP (diluido en tampón de reacción 1X) por pocillo para dar una concentración final de ATP de 10  $\mu$ M. La placa se sella y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo a cada pocillo 5  $\mu$ l de Solución de Detención y después a cada pocillo se añaden 5  $\mu$ l de Mezcla de Detección. La placa se sella, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se realiza la lectura sobre un lector de placa apropiado. Los datos se analizan y se generan las  $CI_{50}$  usando el programa GraphPad Prism 5.

### 45 Ejemplo 2: Expresión y ensayos de inhibición de Abl

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra Abl quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados a continuación. Por ejemplo, los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse por triplicado  
50 contra Abl de longitud completa recombinante o Abl (T315I) (Upstate) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 200  $\mu$ M (2,5  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -32P-ATP) y BSA 0,5 mg/ml. El sustrato peptídico Abl optimizado EAIYAAPFAKKK se usa como un fosfoaceptor (200  $\mu$ M). Las reacciones finalizan aplicando sobre láminas de fosfoceulosa, que se lavan con ácido fosfórico al 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

55

### Ejemplo 3: Expresión y ensayos de inhibición de Hck

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra Hck quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse por triplicado contra Hck de longitud completa recombinante en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 200  $\mu$ M (2,5  $\mu$ Ci de  $\gamma$ -32P-ATP) y BSA 0,5 mg/ml. El sustrato peptídico quinasa de la familia Src optimizado EIYGEFKKK se usa como fosfoaceptor (200  $\mu$ M). Las reacciones finalizan aplicando sobre láminas de fosfoceulosa, que se lavan con ácido fosfórico al 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

65

**Ejemplo 4: Expresión y ensayos de inhibición del receptor de insulina (RI)**

5 La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra la quinasa receptora RI puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse por triplicado contra el dominio de la quinasa receptora de insulina recombinante (Upstate) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 200 μM (2,5 μCi de γ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 0,5 mg/ml. Como sustrato se usa poli E-Y (Sigma; 2 mg/ml). Las reacciones finalizan aplicando sobre nitrocelulosa, que se lava con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con detector de imagen fotoestimulable.

**Ejemplo 5: Expresión y ensayos de inhibición de Src**

15 La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra Src quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse por triplicado contra Src de longitud completa recombinante o Src (T3381) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 200 μM (2,5 μCi de γ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 0,5 mg/ml. El sustrato peptídico quinasa de la familia Src optimizado EIYGEFKKK se usa como un fosfoaceptor (200 μM). Las reacciones finalizan aplicando sobre láminas de fosfoelulosa, que se lavan con ácido fosfórico al 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

**Ejemplo 6: Expresión y ensayos de inhibición de ADN-PK (ADNK)**

25 La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra DNAK quinasa (proteína quinasa dependiente de ADN) puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. La proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK) puede adquirirse en Promega y ensayarse usando el Sistema de Ensayo ADN-PK (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**Ejemplo 7: Expresión y ensayos de inhibición de mTOR**

30 La actividad de uno o más compuestos de la invención para inhibir la actividad mTOR puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra mTOR recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 50 mM, pH 7,5, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Tween al 0,01 % 2,5 mM, ATP 10 μM (2,5 μCi de γ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. Como sustrato se usó PHAS-1/4EBP1 recombinante de rata (Calbiochem; 2 mg/ml). Las reacciones finalizan aplicando sobre nitrocelulosa, que se lava con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

Otros kits o sistemas para ensayar la actividad mTOR se encuentran disponibles en el comercio. Por ejemplo, se puede usar el ensayo Quinasa de Invitrogen de LanthaScreen™ para analizar los inhibidores de mTOR desvelados en el presente documento. Este ensayo es una plataforma FRET resuelta en tiempo que mide la fosforilación de 4EBP1 marcado con GFP mediante mTOR quinasa. La reacción quinasa se realiza en una placa de microtitulación blanca de 384 pocillos. El volumen de reacción total es de 20 ul por pocillo y la composición del tampón de reacción es HEPES 50 mM, pH 7,5, Polisorbato 20 al 0,01 %, EGTA 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 10 mM y DTT 2 mM. En la primera etapa, cada pocillo recibe 2 ul de compuesto de ensayo en dimetilsulfóxido al 20 % dando como resultado una concentración final de DMSO del 2 %. Después, 8 ul de mTOR diluido en tampón de reacción se añaden a cada pocillo para dar una concentración final de 60 ng/ml. Para iniciar la reacción, se añaden 10 ul de una mezcla de ATP/GFP-4EBP1 (diluido en tampón de reacción) a cada pocillo para dar una concentración final de ATP 10 uM y de GFP-4EBP1 0,05 uM. La placa se sella y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo 10 ul por pocillo de una mezcla de anticuerpo Tb-anti-PT46 4EBP1/EDTA (diluido en tampón TR-FRET) para dar una concentración final de anticuerpo de 1,3 nM y EDTA 6,7 mM. La placa se sella, se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente y después se realiza la lectura en un lector de placa configurado para TR-FRET LanthaScreen™. Los datos se analizan y se generan las CI<sub>50</sub> usando el programa GraphPad Prism 5.

**Ejemplo 8: Expresión y ensayos de inhibición del receptor del crecimiento endotelial vascular**

60 La reactividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra el receptor de VEGF puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio de la quinasa receptora KDR recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BME al 0,1 %, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. Como sustrato se usó Poli E-Y (Sigma, 2 mg/ml). Las reacciones finalizaron aplicando sobre nitrocelulosa, que se lavó con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 %

(aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 9: Expresión y ensayos de inhibición del receptor B4 de Efrina (EfB4)**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra EfB4 puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio quinasa del receptor B4 de Efrina recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BME al 0,1 %, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. Como sustrato se usó Poli E-Y (Sigma, 2 mg/ml). Las reacciones finalizaron aplicando sobre nitrocelulosa, que se lavó con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 10: Expresión y ensayos de inhibición del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra EGFR quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio de la quinasa receptora EGF recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BME al 0,1 %, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. Como sustrato se usó Poli E-Y (Sigma, 2 mg/ml). Las reacciones finalizaron aplicando sobre nitrocelulosa, que se lavó con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 11: Expresión y ensayos de inhibición de KIT**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra KIT quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio de la KIT quinasa recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, MnCl<sub>2</sub> 10 mM, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. Como sustrato se usó Poli E-Y (Sigma, 2 mg/ml). Las reacciones finalizaron aplicando sobre nitrocelulosa, que se lavó con NaCl 1 M/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 12: Expresión y ensayos de inhibición de RET**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra RET quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio RET quinasa recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2,5 mM, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. El sustrato peptídico Abl optimizado EAIYAAPFAKCK se usó como un fosfoceptor (200 μM). Las reacciones finalizaron aplicando sobre láminas de fosfocelulosa, que se lavaron con ácido fosfórico 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 13: Expresión y ensayos de inhibición del receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR)**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra PDGFR quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio de quinasa receptora PDG recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2,5 mM, ATP 10 μM (2,5 μCi de μ-<sup>32</sup>P-ATP) y BSA 3 μg/ml. El sustrato peptídico Abl optimizado EAIYAAPFAKCK se usó como fosfoceptor (200 μM). Las reacciones finalizaron aplicando sobre láminas de fosfocelulosa, que se lavaron con ácido fosfórico al 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

#### **Ejemplo 14: Expresión y ensayos de inhibición de tirosina quinasa 3 relacionada con FMS (FLT-3)**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra FLT-3 quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio FLT-3 quinasa recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 2,5 mM, ATP 10

$\mu\text{M}$  (2,5  $\mu\text{Ci}$  de  $\mu\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ) y BSA 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El sustrato peptídico Abl optimizado EAIYAAPFAKKK se usa como fosfoceptor (200  $\mu\text{M}$ ). Las reacciones finalizaron aplicando sobre láminas de fosfocelulosa, que se lavaron con ácido fosfórico al 0,5 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

5

#### **Ejemplo 15: Expresión y ensayos de inhibición de tirosina quinasa receptora TEK (TIE2)**

La actividad cruzada o ausencia de la misma de uno o más compuestos de la invención contra TIE2 quinasa puede medirse de acuerdo con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica o métodos desvelados más adelante. Los compuestos descritos en el presente documento pueden ensayarse contra el dominio TIE2 quinasa recombinante (Invitrogen) en un ensayo que contiene HEPES 25 mM, pH 7,4,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 2 mM,  $\text{MnCl}_2$  10 mM, ATP 10  $\mu\text{M}$  (2,5  $\mu\text{Ci}$  de  $\mu\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ ) y BSA 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Como sustrato se usó Poli E-Y (Sigma; 2 mg/ml). Las reacciones finalizaron aplicando sobre nitrocelulosa, que se lavaron con NaCl 1 mM/ácido fosfórico al 1 % (aproximadamente 6 veces, 5-10 minutos cada una). Las láminas se secan y la radioactividad transferida se cuantifica con un detector de imagen fotoestimulable.

10

15

#### **Ejemplo 16: Ensayos de activación y proliferación de células B**

La capacidad de uno o más compuestos de la invención para inhibir la activación y proliferación de células B se determinó de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se estableció un ensayo de proliferación celular *in vitro* que medía la actividad metabólica de células vivas. Este ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos usando reducción con Azul Alamar. Células B esplénicas Balb/c se purificaron sobre un gradiente Ficoll-Paque™PLUS seguido por separación celular magnética usando un Kit de Aislamiento de células B MACS (Miletenyi). Las células se sembraron en placas en 90  $\mu\text{l}$  a 50.000 células/pocillo en Medio de Células B (RPMI + FBS al 10 % + Pen/Estrep. + bME 50  $\mu\text{M}$  + HEPES 5 mM). Un compuesto desvelado en el presente documento se diluyó en Medio de Células B y se añadió en un volumen de 10  $\mu\text{l}$ . Las placas se incubaron durante 30 min a 37 °C y con  $\text{CO}_2$  al 5 % (concentración final de DMSO al 0,2 %). Después se añadió un cóctel de estimulación de células B 50  $\mu\text{l}$  que contenía LPS 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o anti-IgM de ratón de Burro F(ab')<sub>2</sub> más IL4 de ratón recombinante 2 ng/ml en Medio de Células B. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C y con  $\text{CO}_2$  al 5 %. Se añadió un volumen de 15  $\mu\text{l}$  de reactivo Azul Alamar a cada pocillo y las placas se incubaron durante 5 horas a 37 °C y con  $\text{CO}_2$  al 5 %. La fluorescencia del Azul Alamar se leyó a 560 Ex/590 Em, y los valores de  $\text{CI}_{50}$  o  $\text{CE}_{50}$  se calcularon usando el programa GraphPad Prism 5.

20

25

30

#### **Ejemplo 17: Ensayo de proliferación de líneas celulares tumorales**

La capacidad de uno o más compuestos de la invención para inhibir la proliferación de líneas celulares tumorales se determinó de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de proliferación celular *in vitro* para medir la actividad metabólica de células vivas. El ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos usando reducción con Azul Alamar. Las líneas de células tumorales humanas se obtuvieron en la ATCC (por ejemplo, MCF7, U-87 MG, MDA-MB-468, PC-3 y cualquier otra línea celular indicada en la Figura 1A-B), crecieron hasta confluencia en matraces T75, se tripsinizaron con tripsina al 0,25 %, se lavaron una vez con Medio Celular Tumoral (DMEM + FBS al 10 %) y se sembraron en placas en 90  $\mu\text{l}$  a 5.000 células/pocillo en Medio de Células Tumorales. Un compuesto desvelado en el presente documento se diluyó en Medio Celular Tumoral y se añadió a un volumen de 10  $\mu\text{l}$ . Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C y con  $\text{CO}_2$  al 5 %. Se añadió un volumen de 10  $\mu\text{l}$  de reactivo Azul Alamar a cada pocillo y las placas se incubaron durante 3 horas a 37 °C y con  $\text{CO}_2$  al 5 %. La fluorescencia del Azul Alamar se leyó a 560 Ex/590 Em y los valores de  $\text{CI}_{50}$  se calcularon usando el programa GraphPad Prism 5. Los resultados representados en la Figura 1A, Figura 1B y Figura 7A muestran que un compuesto de la presente invención inhibe eficazmente la proliferación de una amplia serie de células tumorales. En algún caso, el compuesto de la invención produce una inhibición de proliferación celular del 50 % a una concentración que es de uno a dos órdenes de magnitud menor que el de un fármaco antineoplásico convencional cuando se ensaya en las mismas condiciones.

35

40

45

50

#### **Ejemplo 18: Actividad antitumoral *in vivo***

Los compuestos descritos en el presente documento pueden evaluarse en un panel de modelos de tumor humano y murino.

##### Modelos de tumor resistente a paclitaxel

##### *1. Modelo de carcinoma de ovario obtenido clínicamente*

Este modelo de tumor se estableció a partir de una biopsia tumoral de un paciente con cáncer de ovario. La biopsia tumoral se extrajo del paciente.

65

Los compuestos descritos en el presente documento se administran a ratones desnudos portadores de tumores estadificados usando un programa cada 2 días x 5.

## 2. Xenoinjerto de carcinoma de ovario humano A2780Tax (Tubulina mutada)

A2780Tax es un modelo de carcinoma de ovario humano resistente a paclitaxel. Procede de la línea A2780 parental sensible por co-incubación de células con paclitaxel y verapamil, un agente inverso MDR, *resistente a múltiples fármacos*. Se ha mostrado que su mecanismo de resistencia no está relacionado con MDR y se atribuye a una mutación en el gen que codifica la proteína beta-tubulina.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a ratones portadores de tumores estadificados en un régimen cada 2 días x 5.

## 3. Xenoinjerto de carcinoma de colon humano HCT116/VM46 (resistente a múltiples fármacos)

HCT116/VM46 es un carcinoma de colon resistente a MDR desarrollado a partir de la línea parental HCT116 sensible. *In vivo*, el crecimiento en ratones desnudos, HCT116/VM46 ha demostrado regularmente alta resistencia a paclitaxel.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a ratones portadores de tumores estadificados en un régimen cada 2 días x 5.

## 5. Modelo de sarcoma murino M5076

M5076 es un fibrosarcoma de ratón que por naturaleza es resistente a paclitaxel *in vivo*

Los compuestos descritos en el presente documento pueden administrarse a ratones portadores de tumores estadificados en un régimen cada 2 días x 5.

Uno o más compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otros agentes terapéuticos *in vivo* en xenoinjertos de carcinoma de colon humano resistente a múltiples fármacos HCT/VM46 o cualquier otro modelo conocido en la técnica incluyendo los descritos en el presente documento.

Se espera que uno o más compuestos de la presente invención sean fuertes inhibidores del crecimiento tumoral *in vivo* en las condiciones ensayadas.

### 35 Ejemplo 19: Ensayo de estabilidad con microsomas

La estabilidad de uno o más compuestos de la invención se determina de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, la estabilidad de uno o más compuestos de la invención se establece mediante un ensayo *in vitro*. En particular, se establece un ensayo de estabilidad de microsomas *in vitro* que mide la estabilidad de uno o más compuestos de la invención cuando reaccionan con microsomas de ratón, rata o ser humano de hígado. La reacción de microsomas con los compuestos se realiza en tubos de Eppendorf de 1,5 ml. Cada tubo contiene 0,1  $\mu$ l de NADPH 10,0 mg/ml; 75  $\mu$ l de 20,0 mg/ml de microsoma de hígado de ratón, rata o ser humano; 0,4  $\mu$ l de tampón fosfato 0,2 M y 425  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O. El tubo de control negativo (sin NADPH) contiene 75  $\mu$ l de 20,0 mg/ml de microsomas de hígado de ratón, rata o ser humano; 0,4  $\mu$ l de tampón fosfato 0,2 M y 525  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O. La reacción comenzó añadiendo 1,0  $\mu$ l de compuesto de ensayo 10,0 M. Los tubos de reacción se incubaron a 37 °C. Se recogió una muestra de 100  $\mu$ l en un nuevo tubo Eppendorf que contenía 300  $\mu$ l de Metanol frío a los 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos de reacción. Las muestras se centrifugaron a 15.000 rpm para retirar las proteínas. El sobrenadante de la muestra centrifugada se transfirió a un nuevo tubo. La concentración del compuesto estable después de la reacción con microsomas en el sobrenadante se midió mediante Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas (LC-MS). Cuando la estabilidad de los microsomas de uno o más compuestos de la presente invención se ensaya en esta condición tiene un T<sub>1/2</sub> (min) bien dentro de un intervalo necesario para el desarrollo clínico.

### 55 Ejemplo 20: Ensayo de estabilidad en plasma

La estabilidad de uno o más compuestos de la invención en plasma se determina de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**: 1019-1026. El siguiente procedimiento es un ensayo HPLC-MS/MS que utiliza plasma humano; también se dispone de plasma de otras especies incluyendo mono, perro, rata y ratón. Plasma humano heparinizado congelado, se descongeló en un baño con agua fría y se centrifugó durante 10 minutos a 2000 rpm a 4 °C antes de su uso. Se añadió un compuesto de la invención de una solución madre de 400  $\mu$ M a una alícuota de plasma previamente calentado para dar un volumen de ensayo final de 400  $\mu$ l (u 800  $\mu$ l para la determinación de la semivida), que contiene el compuesto de ensayo 5  $\mu$ M y DMSO al 0,5 %. Las reacciones se incubaron, con agitación, durante 0 minutos y 60 minutos a 37 °C, o durante 0, 15, 30, 45 y 60 minutos a 37 °C para la determinación de la semivida. Las reacciones se detuvieron transfiriendo 50  $\mu$ l de la mezcla de incubación a 200  $\mu$ l de acetonitrilo enfriado en hielo y se mezclaron con agitación

durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron a 6000 x g durante 15 minutos a 4 °C y se extrajeron 120 µl de sobrenadante en tubos transparentes. Las muestras se evaporaron después hasta la sequedad y se enviaron para análisis HPLC-MS/MS.

- 5 Cuando se desee, uno o más compuestos de control o referencia (5 µM) se ensayan simultáneamente con los compuestos de ensayo: un compuesto, propoxicaína, con baja estabilidad en plasma y otro compuesto, propantelina, con estabilidad en plasma intermedia.

- 10 Las muestras se reconstituyeron en acetonitrilo/metanol/agua (1/1/2, v/v/v) y se analizaron mediante (RP)HPLC-MS/MS usando monitorización de reacción seleccionada (MRS). Las condiciones de HPLC consistían en una bomba binaria LC con automuestreador, una columna en modo mixto, C12 de 2 x 20 mm y un programa de gradiente. Las áreas pico correspondientes a los analitos se registraron mediante HPLC-MS/MS. La proporción del compuesto parental restante después de 60 minutos con respecto a la cantidad restante en tiempo cero, expresada como porcentaje, se presentó como estabilidad plasmática. En el caso de la determinación de la semivida, esta se estimó a partir de la pendiente del rango lineal inicial de la curva logarítmica del compuesto restante (%) frente al tiempo, suponiendo cinéticas de primer orden.

### Ejemplo 21: Estabilidad química

- 20 La estabilidad química de uno o más compuestos de la invención se determinó de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. A continuación se detalla un procedimiento ejemplar para determinar la estabilidad química de un compuesto objeto. El tampón por defecto usado para el ensayo de estabilidad química es solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4; también pueden usarse otros tampones adecuados. Se añadió un compuesto de la invención de una solución madre de 100 µM a una alícuota de PBS (por duplicado) para dar un volumen de ensayo final de 400 µl, que contenía el compuesto de ensayo 5 µM y DMSO al 1 % (para la determinación de la semivida se preparó un volumen de muestra total de 700 µl). Las reacciones se incubaron con agitación durante 0 minutos y 24 horas a 37 °C; para la determinación de la semivida las muestras se incubaron durante 0, 2, 4, 6 y 24 horas. Las reacciones se detuvieron añadiendo inmediatamente 100 µl de la mezcla de incubación a 100 µl de acetonitrilo y agitando vorticialmente durante 5 minutos. Las muestras se guardaron después a -20 °C hasta su análisis mediante HPLC-MS/MS. Cuando se desee, un compuesto de control o un compuesto de referencia, tal como clorambucilo (5 µM) se ensaya simultáneamente con un compuesto de la invención de interés, ya que este compuesto se hidroliza principalmente en el transcurso de 24 horas. Las muestras se analizaron mediante (RP)HPLC-MS/MS usando monitorización de reacción seleccionada (MRS). Las condiciones de HPLC consistían en una bomba binaria LC con automuestreador, una columna en modo mixto, C12 de 2 x 20 mm y un programa de gradiente. Las áreas pico correspondientes a los analitos se registraron mediante HPLC-MS/MS. La proporción del compuesto parental restante después de 60 minutos con respecto a la cantidad restante en tiempo cero, expresada como porcentaje, se presentó como estabilidad plasmática. En el caso de la determinación de la semivida, esta se estimó a partir de la pendiente del rango lineal inicial de la curva logarítmica del compuesto restante (%) frente al tiempo, suponiendo cinéticas de primer orden.

### Ejemplo 22: Ensayo Akt quinasa

- 45 Las células que comprenden componentes de la ruta Akt/mTOR, incluyendo pero sin limitación, mioblastos L6, células B-ALL, células B, células T, células de leucemia, células de médula ósea, células transducidas por p190, células positivas para el cromosoma filadelfia (Fi+), y fibroblastos embrionarios de ratón, crecen típicamente en medio de crecimiento celular tal como DMEM complementado con suero bovino fetal y/o antibióticos, y crecen hasta confluencia.

- 50 Para comparar el efecto de uno o más compuestos desvelados en el presente documento sobre la activación de Akt, células seleccionadas se privaron de suero durante una noche y se incubaron con uno o más compuestos desvelados en el presente documento o con DMSO aproximadamente al 0,1 % durante aproximadamente de 1 minuto a aproximadamente 1 hora antes de la estimulación con insulina (por ejemplo, 100 nM) durante aproximadamente de 1 minuto a aproximadamente 1 hora. Las células se lisaron por raspado en tampón de lisis enfriado con hielo que contenía detergentes tal como dodecilsulfato sódico e inhibidores de proteasa (por ejemplo, PMSF). Después de poner en contacto las células con tampón de lisis, la solución se sometió brevemente a ultrasonido, se clarificó por centrifugación, se resolvió mediante SDS-PAGE, se transfirió a nitrocelulosa o a PVDF y se realizó inmunotransferencia usando anticuerpos contra fosfo Akt S473, fosfo Akt T308, Akt, y β-actina (Cell Signaling Technologies).

- 60 Los resultados demuestran que uno o más compuestos de la invención inhiben la fosforilación, estimulada por insulina, de Akt en S473. Como alternativa, algunos compuestos de la invención inhiben adicionalmente la fosforilación, estimulada por insulina, de Akt en T308. La clase de compuestos que puede inhibir la señalización de Akt más eficazmente que la rapamicina como se muestra en el presente documento miden aquellos (por ejemplo, compuestos mostrados en la Tabla 1) que inhiben mTORC2 y mTORC1.

65

**Ejemplo 23: Señalización de quinasa en sangre**

La señalización de PI3K/Akt/mTor se mide en células sanguíneas usando el método phosflow (Methods Enzymol. 2007; 434: 131-54). La ventaja de este método es que es, por naturaleza, un ensayo unicelular de manera que puede detectarse la heterogeneidad celular en vez de promedios de población. Esto permite la distinción concurrente de estados de señalización en diferentes poblaciones definidas por otros marcadores. Phosflow es también altamente cuantitativo. Para ensayar los efectos de uno o más compuestos de la invención, esplenocitos no fraccionados, o células mononucleares de sangre periférica, se estimularon con anti-CD3 para iniciar la señalización de receptores de células T. Después, las células se fijaron y se tiñeron con marcadores de superficie y fosfoproteínas intracelulares. Se esperaba que los inhibidores desvelados en el presente documento inhibiesen la fosforilación mediada por anti-CD3 de Akt-S473 y S6, mientras que la rapamicina inhibe la fosforilación de S6 y potencia la fosforilación de Akt en las condiciones ensayadas.

De manera similar, se incubaron alícuotas de sangre entera durante 15 minutos con vehículo (por ejemplo, DMSO al 0,1 %) o con inhibidores de quinasa a diversas concentraciones, antes de la adición de estímulos para entrecruzar el receptor de células T (RCT) (anti-CD3 con anticuerpo secundario) o el receptor de células B (RCB) usando anticuerpo contra cadena ligera kappa (fragmentos Fab'2). Después de aproximadamente 5 y 15 minutos, las muestras se fijaron (por ejemplo, con paraformaldehído al 4 % frío) y se usaron para phosflow. La tinción en superficie se usó para diferenciar células T y B usando anticuerpos dirigidos contra marcadores de superficie celular que son conocidos en la técnica. El nivel de fosforilación de sustratos quinasa tales como Akt y S6 se mide después incubando las células fijadas con anticuerpos marcados específicos contra las isoformas fosforiladas de estas proteínas. La población de células se analizó después mediante citometría de flujo. Se espera que los resultados muestren que uno o más de los compuestos de la invención puedan inhibir selectivamente la señalización de uno o más miembros de PI3K, mTOR y Akt en células sanguíneas en las condiciones ensayadas.

**Ejemplo 24: Ensayo de formación de colonias**

Células de médula ósea murina transformadas recientemente con un retrovirus p190 BCR-Abl (en el presente documento denominadas células transducidas con p190) se sembraron en placa en presencia de diversas combinaciones de fármacos en medio de metilcelulosa M3630 durante aproximadamente 7 días con IL-7 humana recombinante en suero aproximadamente 30%, y el número de colonias formado se contó mediante inspección visual al microscopio. Se esperaba que los compuestos de la invención potenciasen los efectos de una concentración máxima al 50 % de agentes quimioterapéuticos conocidos, tales como, y sin limitación, imatinib, rapamicina y dasatinib a las concentraciones examinadas.

Como alternativa, se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana de sujetos positivos (Fi+) y negativos (Fi-) al cromosoma Filadelfia, después de diagnóstico inicial o recidiva. Se aislaron células vivas y se enriquecieron con progenitores de células B CD19+ CD34+. Después de una noche en cultivo líquido, las células se sembraron en placa en methocult GF+ H4435 (Stem Cell Technologies) complementado con citocinas (IL-3, IL-6, IL-7, G-CSF, GM-CSF, CF, ligando Flt3 y eritropoyetina) y diversas concentraciones de agentes quimioterapéuticos conocidos en combinación con cualquiera de los compuestos de la invención. Las colonias se contaron al microscopio 12-14 días después. Este método puede usarse para ensayar la actividad aditiva o sinérgica de diversas terapias de combinación utilizando la composición objeto. Se esperaba que uno o más compuestos de la presente invención fuesen inhibidores fuertes y selectivos de la formación de colonias de células transducidas con p190 en las condiciones ensayadas.

**Ejemplo 25: Efecto *in vivo* de inhibidores de quinasa sobre células leucémicas**

Ratones receptores hembra se irradiaron letalmente a partir de una fuente  $\gamma$  en dos dosis de aproximadamente 4 horas de diferencia, con aproximadamente 5Gy cada una. Alrededor de 1 h después de la segunda dosis de radiación, los ratones recibieron inyección i.v. de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células leucémicas (por ejemplo, células humanas o murinas Fi+, o células de médula ósea transducidas con p190). Estas células se administraron conjuntamente con una dosis radioprotectora de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células de médula ósea normales de ratones donantes de 3-5 semanas de vida. A los receptores se les proporcionó antibióticos en el agua y se monitorizaron diariamente. Los ratones que enfermaron después de aproximadamente 14 días se sometieron a eutanasia y se extrajeron los órganos linfoides para su análisis. El tratamiento con inhibidor de quinasa comenzó aproximadamente 10 días después de la inyección con células leucémicas y continuó diariamente hasta que los ratones enfermaron o hasta un máximo de aproximadamente 35 días pos-trasplante. Los inhibidores se proporcionaron por sonda oral.

Aproximadamente el día 10 (pre-tratamiento) y después de la eutanasia (pos-tratamiento) se recogieron células de sangre periférica, se pusieron en contacto con anticuerpos anti-hCD4 marcados y se contaron mediante citometría de flujo. Este método puede usarse para demostrar que el efecto sinérgico de uno o más compuestos de la invención en solitario o en combinación con agentes quimioterapéuticos conocidos, reduce significativamente los recuentos de células sanguíneas leucémicas en comparación con el tratamiento con agentes quimioterapéuticos conocidos (por ejemplo, Gleevec) en solitario en las condiciones ensayadas.

**Ejemplo 26: Inhibición de la proliferación de células tumorales deficientes en actividad PTEN pero que expresan PI3-quinasas**

La capacidad de uno o más compuestos de la invención para inhibir la proliferación de células tumorales deficientes en actividad PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) pero que expresan PI3-quinasas, se ensayó de acuerdo con el procedimiento detallado en el ejemplo 17. Como se muestra en la Figura 7A, un compuesto de la presente invención (por ejemplo, un compuesto de la Tabla 1) produce una inhibición del 50 % de proliferación de células PC-3 a una concentración que es al menos alrededor de dos órdenes de magnitud inferior en comparación con la rapamicina.

El análisis de inmunotransferencia tipo Western reveló que el compuesto de la invención podía inhibir la fosforilación de AKT (S473) y AKT (T308) así como de otras dianas aguas debajo de la ruta de señalización de mTor a un grado mayor que la rapamicina. Véase la Figura 7B. En particular, células PC-3 se sembraron a aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 24 pocillos en un medio de cultivo que contenía FBS al 10 %. Las células se dejaron crecer a una confluencia de aproximadamente 80 %. Las células se trataron durante 2 horas a 37 °C en una incubadora con CO<sub>2</sub> con medio de cultivo celular reciente (FBS al 10 %) con un compuesto de la presente invención o rapamicina a las concentraciones indicadas. Después de la incubación, las células se lisaron añadiendo tampón de Lisis Celular 1X (200 µl por pocillo de una placa de 24 pocillos de células confluentes). Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE en geles de gradiente 4-20 % y se usaron técnicas de transferencia en semiseco convencionales para transferir la proteína a membranas de nitrocelulosa. Se detectaron p-AKT(473), p-S6K y p-4EBP1 usando anticuerpos primarios de conejo contra ser humano (Cell Signaling, Danvers, MA) seguido de un anticuerpo secundario contra conejo conjugado con HRP (Cell Signaling, Danvers, MA). El sustrato LumiGLO (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) se usó para detectar las fosfoproteínas en la inmunotransferencia tipo Western.

**Ejemplo 27: Tratamiento de ratones de modelo de enfermedad de lupus**

Ratones que carecían del receptor inhibitor FcγRIIb que contrarrestan la señalización de PI3K en células B desarrollan lupus con alta penetración. Los ratones genosuprimidos (*knockout*) FcγRIIb (R2KO, Jackson Labs) se consideran un modelo válido de la enfermedad humana ya que algunos sujetos con lupus muestran expresión o función disminuida de FcγRIIb (S. Bolland y J.V. Ravetch 2000. *Immunity* 12: 277-285).

Los ratones R2KO desarrollan una enfermedad similar al lupus con anticuerpos antinucleares, glomerulonefritis y proteinuria al cabo de aproximadamente 4-6 meses de vida. Para estos experimentos, el análogo de rapamicina RAD001 (disponible en Laboratorios LC) se usó como un compuesto de referencia y se administró por vía oral. Se ha observado que este compuesto mejora los síntomas del lupus en el modelo B6. S1e1zSle3z (T. Wu et al. *J. Clin Invest.* 117: 2186-2196).

Se trataron ratones del modelo de enfermedad de lupus tales como R2KO, BXSB o MLR/lpr a alrededor de 2 meses de vida, aproximadamente durante dos meses. Los ratones recibieron dosis de: vehículo, RAD001 a aproximadamente 10 mg/kg, o compuestos desvelados en el presente documento a aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. Se obtuvieron muestras de sangre y orina durante aproximadamente el periodo del ensayo y se ensayaron con respecto a anticuerpos antinucleares (en diluciones de suero) o con respecto a concentraciones de proteína (en orina). También se ensayó el suero con respecto a anticuerpos anti-ADNmc y anti-ADNbc por ELISA. Los animales se sometieron a eutanasia el día 60 y los tejidos se recogieron para medir el peso del bazo y la enfermedad renal. La glomerulonefritis se evaluó en secciones de riñón teñidas con H y E. Otros animales se estudiaron durante aproximadamente dos meses después de suprimir el tratamiento, usando los mismos criterios de valoración.

Este modelo establecido en la técnica puede emplearse para probar que los inhibidores de quinasa desvelados en el presente documento pueden suprimir o retrasar la aparición de síntomas de lupus en ratones del modelo de enfermedad de lupus.

**Ejemplo 28: Ensayo de trasplante de médula ósea murina**

Ratones receptores hembra se irradiaron letalmente a partir de una fuente de rayos γ. Aproximadamente 1 h después de la dosis de radiación, los ratones recibieron inyección de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células leucémicas de cultivos de pase temprano transducidos con p190 (por ejemplo, como se describe en *Cancer Genet Cytogenet.* Agosto 2005; 161(1): 51-6). Estas células se administraron conjuntamente con una dosis radioprotectora de aproximadamente  $5 \times 10^6$  células de médula ósea normales de ratones donantes de 3-5 semanas de vida. A los receptores se les proporcionó antibióticos en el agua y se monitorizaron diariamente. Los ratones que enfermaron después de aproximadamente 14 días se sometieron a eutanasia y se extrajeron los órganos linfoides para su análisis por citometría de flujo y/o enriquecimiento magnético. El tratamiento comenzó aproximadamente el día 10 y continuó diariamente hasta que los ratones enfermaron o después de un máximo de aproximadamente 35 días post-trasplante. Los fármacos se proporcionaron por sonda oral (p.o.). En un experimento piloto se identificó una dosis de agente quimioterapéutico que no era curativa pero que retrasaba la aparición de la leucemia durante

aproximadamente una semana o menos; los controles se trataron con vehículo o se trataron con el agente quimioterapéutico, que previamente se mostró que retrasaba, pero que no curaba, la leucemogénesis en este modelo (por ejemplo, imatinib a aproximadamente 70 mg/kg dos veces al día). Para la primera fase se usaron células p190 que expresaban eGFP y el análisis *postmortem* se limitó a la enumeración del porcentaje de células leucémicas en médula ósea, bazo y ganglios linfáticos (GL) mediante citometría de flujo. En la segunda fase, se usaron células p190 que expresaban una forma sin cola de CD4 humano y el análisis *postmortem* incluyó separación magnética de células hCD4+ de bazo seguido de análisis de inmunotransferencia de criterios de valoración de señalización clave: p Akt – T308 y S473; pS6 y p4EBP-1. Como controles para la detección por inmunotransferencia, las células separadas se incubaron en presencia o en ausencia de inhibidores de quinasa de la presente divulgación antes de la lisis. Opcionalmente, se usó "phosflow" para detectar p Akt - S473 y pS6-S235/236 en células hCD4 seleccionadas sin separación previa. Estos estudios de señalización son particularmente útiles, por ejemplo, si ratones tratados con fármaco no han desarrollado leucemia clínica en el momento del día 35. Se generaron gráficas de Kaplan-Meier de supervivencia y se realizaron análisis estadísticos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los resultados de las células p190 se analizaron de manera individual así como acumulativa.

Semanalmente se obtuvieron muestras de sangre periférica (100-200  $\mu$ l) de todos los ratones, comenzando el día 10 inmediatamente antes de comenzar el tratamiento. Se usó plasma para medir concentraciones de fármaco y las células se analizaron para marcadores de leucemia (eGFP o hCD4) y biomarcadores de señalización como se describe en el presente documento. Se esperaba que los resultados del análisis demostraran dosis terapéuticas eficaces de los compuestos desvelados en el presente documento para inhibir la proliferación de células leucémicas. También se esperaba que la terapia de combinación de los inhibidores desvelados en el presente documento con otros agentes quimioterapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, los desvelados en el presente documento (por ejemplo, gleevec y dasatinib), mostrase un mayor grado de eficacia o una menor toxicidad en comparación con el uso de un solo agente quimioterapéutico.

#### Ejemplo 29: Ensayo farmacocinético en roedores

Para estudiar la farmacocinética de los compuestos de la invención, un conjunto de ratones de 4-10 semanas de vida se agrupó de acuerdo con la siguiente tabla:

Grupo n.º	Ratones/grupo	Administración del compuesto del día 1 al día 7		
		(mg/kg)	Vía	Régimen
1	3	1	Oral	C2D Durante 7 días
2	3	3		
3	3	10		
4	3	30		
5	3	60		

Como alternativa, los compuestos se dosificaron fuertemente (por ejemplo una vez) y después de un tiempo (por ejemplo aproximadamente 0, 30 s, 1 m, 5 m, 10 m, 20 m, 30 m, 1 h, 2 h, 3 h, 5 h, 8 h, 10 h, 12 h, 1 d, 2 d, etc.) la sangre se recogió y se analizó como se describe más adelante.

Los compuestos de la invención se disolvieron en un vehículo apropiado (por ejemplo, 1-metil-2-pirrolidona al 5 %, polietilenglicol 400 al 85 %, Solutor al 10 %) y se administraron por vía oral a intervalos diarios de 12 horas. Todos los animales se sometieron a eutanasia con CO<sub>2</sub> 2 horas después de administrar el compuesto final. La sangre se recogió inmediatamente y se mantuvo en hielo para el aislamiento del plasma. El plasma se aisló centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos. El plasma recogido se congeló para la detección farmacocinética.

Se espera que los resultados demuestren los parámetros farmacocinéticos, tales como absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad para los compuestos de la invención.

#### Ejemplo 30: Uso de la combinación de inhibidores de PI3K $\delta$ y de agentes que inhiben la producción o actividad de IgE

Los compuestos de la invención pueden presentar eficacia sinérgica o aditiva cuando se administran en combinación con un inhibidor selectivo para una o más PI3-quinasas, por ejemplo, PI3K $\delta$ .

Los inhibidores de PI3K $\delta$  pueden ser eficaces en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias (EAI), por ejemplo, artritis reumatoide. Cuando un inhibidor de PI3K $\delta$  causa un nivel no deseado de producción de IgE, se puede elegir administrarlo en combinación con un agente que inhiba la producción de IgE o la actividad de IgE, tal como un inhibidor de mTORC1 y/o mTORC2 desvelado en el presente documento. Adicionalmente, la administración de inhibidores de PI3K $\delta$  o PI3K $\delta/\gamma$  en combinación con inhibidores de mTOR también puede mostrar sinergia a través de la inhibición potenciada de la ruta PI3K. Para establecer el efecto de dicho tratamiento de

combinación en EAll pueden usarse diversos modelos *in vivo* e *in vitro*, incluyendo, pero sin limitación, (a) ensayo de producción de anticuerpos con células B *in vitro*, (b) ensayo con TNP *in vivo* y (c) modelo de artritis inducida por colágeno en roedores.

#### 5 (a) Ensayo con células B

Los ratones se sometieron a eutanasia y se extirparon los bazo y se dispersaron a través de una malla de nylon para generar una suspensión unicelular. Los esplenocitos se lavaron (después de retirar los eritrocitos mediante choque osmótico) y se incubaron con anticuerpo anti-CD43 y anti-Mac-1 conjugado con microperlas (Miltenyi Biotec). Las células unidas a las perlas se separaron de las células no unidas usando un separador magnético celular. La columna magnetizada retiene las células no deseadas y las células B en reposo se recogen en el flujo de paso. Las células B purificadas se estimulan con lipopolisacárido o con un anticuerpo anti-CD40 e interleucina 4. Las células B estimuladas se tratan solo con vehículo o con un inhibidor de PI3K $\delta$  con y sin inhibidores de mTOR, tales como rapamicina, rapálogos o los inhibidores de mTORC1/C2 desvelados en el presente documento. Se espera que los resultados muestren que en presencia solo de inhibidores de mTOR (por ejemplo, rapamicina, así como inhibidores sujeto que pueden inhibir tanto a mTORC1 como a mTORC2), haya poco o ningún efecto sustancial sobre la respuesta de IgG e IgE. Sin embargo, en presencia de inhibidores de PI3K $\delta$  y mTOR, se espera que las células B exhiban una respuesta a IgG disminuida en comparación con las células B tratadas solo con vehículo, y se espera que las células B exhiban una respuesta a IgG disminuida en comparación con la respuesta de células B tratadas solo con inhibidores de PI3K $\delta$ .

#### (b) Ensayo con TNP

Los ratones se inmunizaron con TNP-Ficoll o TNP-KHL y se trataron con: vehículo, un inhibidor de PI3K $\delta$ , un inhibidor de mTOR, por ejemplo, rapamicina, o con un inhibidor de PI3K $\delta$  en combinación con un inhibidor de mTOR tal como rapamicina. La IgE en suero específica de antígeno se midió mediante ELISA usando placas recubiertas con TNP-BSA y anticuerpos marcados específicos de isotipo. Este ensayo puede usarse para probar que los ratones tratados solo con un inhibidor de mTOR exhiben escaso o ningún efecto sustancial sobre la respuesta de IgG3 específica de antígeno y que no hay elevación estadísticamente significativa en la respuesta de IgE en comparación con el control vehículo. Este ensayo también puede usarse para probar que los ratones tratados tanto con inhibidor de PI3K $\delta$  como con inhibidor de mTOR, exhiben una reducción en la respuesta de IgG3 específica de antígeno en comparación con los ratones tratados solo con vehículo. Adicionalmente, este ensayo puede emplearse para probar que los ratones tratados tanto con inhibidor de PI3K $\delta$  como con inhibidor de mTOR exhiben una disminución en la respuesta de IgE en comparación con los ratones tratados solo con inhibidor de PI3K $\delta$ .

#### (c) Modelo de artritis inducida por colágeno en ratas

Ratas hembra Lewis se anestesiaron y recibieron inyecciones de colágeno preparadas y administradas el día 0 como se ha descrito previamente. El día 6, los animales se anestesiaron y recibieron una segunda inyección de colágeno. Las mediciones con calibrador de las articulaciones del tobillo izquierdo y derecho (antes de la enfermedad) se realizaron el día 9. Generalmente, al cabo de 10-11 días, se produce la artritis y las ratas se asignan aleatoriamente en grupos de tratamiento. La aleatorización se realiza después de establecer claramente la inflamación de la articulación del tobillo y de que existen pruebas evidentes de enfermedad bilateral.

Después de seleccionar a un animal para incorporarle en el estudio, comenzó el tratamiento. Los animales recibieron vehículo, inhibidor de PI3K $\delta$ , o inhibidor de PI3K $\delta$  en combinación con un inhibidor de mTOR. La dosificación se administró los días 1-6. Las ratas se pesaron los días 1-7 después del establecimiento de la artritis y todos los días se tomaron mediciones del tobillo con un calibrador. Los pesos corporales finales se tomaron el día 7 y los animales se sometieron a eutanasia.

Este ensayo puede usarse para probar que el tratamiento de combinación usando un inhibidor de PI3K $\delta$  y un inhibidor de mTOR proporciona una mayor eficacia que el tratamiento solo con inhibidor de PI3K $\delta$ .

#### Ejemplo 31: Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*

**Líneas celulares:** Se obtuvieron líneas de células tumorales tales como, A549, U87, ZR-75-1 y 786-O de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Las células proliferaron y se conservaron criogénicamente a cada pase temprano (por ejemplo pase 3). Se usó una alícuota para la proliferación adicional para conseguir suficientes células para un estudio TGI (aproximadamente en el pase 9).

#### Animales

Se obtuvieron ratones hembra, desnudos atímicos, en Harlan. Los ratones recibidos tenían de 4 a 6 semanas de vida. Antes de tratar con los ratones, estos se aclimataron durante aproximadamente de un día a dos semanas. Los ratones se enjaularon en jaulas microaisladoras y se mantuvieron en condiciones sin patógenos específicos. Los

ratones se alimentaron con pienso para ratones irradiado y se proporcionó agua esterilizada con autoclave disponible a voluntad.

5 **Modelo de xenoinjerto tumoral:** Los ratones recibieron una inoculación subcutánea en el flanco derecho de 0,01 a 0,5 ml de células tumorales, tales como las indicadas anteriormente (aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^8$  células/ratón). De cinco a 10 días después de la inoculación, se midieron los tumores usando calibradores y se calculó el peso del tumor, por ejemplo, usando un programa informático de gestión de estudios con animales, tal como Study Director V.1.6.70 (Study Log). Los ratones con tamaños tumorales de aproximadamente 120 mg se emparejaron en grupos deseados usando Study Director (Día 1). Los pesos corporales se registraron cuando los ratones estaban emparejados. Las mediciones de volumen del tumor y de peso corporal se tomaron de una a cuatro veces a la semana y se realizaron observaciones macroscópicas al menos una vez al día. El Día 1, los compuestos de la presente invención y los compuestos de referencia, así como el control con vehículo, se administraron mediante sonda oral o por vía intravenosa, i.v., como se ha indicado. El último día del experimento, los ratones se sacrificaron y sus tumores se extirparon 1-4 horas después de la dosis final. Los tumores se escindieron y se cortaron en dos secciones. Una tercera parte del tumor se fijó en formalina y se incluyó en bloques de parafina y las dos terceras partes restantes del tumor se congelaron inmediatamente y se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$ .

**Datos y análisis estadísticos:** La inhibición del crecimiento tumoral (ICT) media se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$RT = \left[ 1 - \frac{(\text{Peso tumoral (Final)})}{(\text{Peso tumoral (Día 1)})} \right] \times 100\%$$

Los tumores que disminuían de tamaño comenzando desde el Día 1 se eliminaron de los cálculos. La reducción tumoral (RT) individual se calculó usando la fórmula anterior para tumores que mostraban regresión con respecto al peso tumoral el Día 1. Se calculó y se indicó la reducción tumoral media de cada grupo.

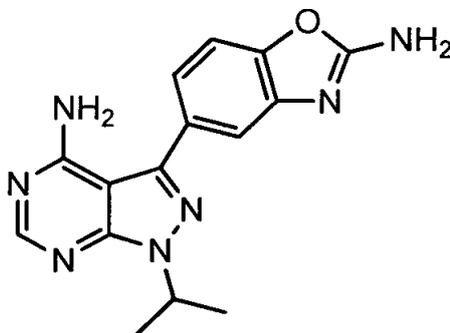
El modelo puede emplearse para mostrar si los compuestos de la invención pueden inhibir el crecimiento de células tumorales, incluyendo, pero sin limitación, crecimiento de células de carcinoma renal, crecimiento de células de cáncer de mama, crecimiento de células de cáncer de pulmón o crecimiento de células de glioblastoma en las condiciones ensayadas.

Como se muestra en las Figuras 3A-3B, un compuesto de la invención de Fórmula I'-A' reduce el tamaño tumoral en el modelo de xenoinjerto de glioblastoma humano U87 de una manera dependiente de la dosis durante un periodo de tratamiento de 14 días. La Figura 3C muestra que el compuesto no tiene efectos tóxicos sustanciales sobre el animal ya que no hubo pérdida de peso significativa durante el tratamiento. Los tumores extirpados (Figura 3C) se examinaron adicionalmente mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western que reveló la inhibición de la señalización de mTOR/Akt por el compuesto de la invención (Figuras 4B y 10). En particular, la inhibición de la señalización de mTOR/Akt se puso de manifiesto mediante una disminución en la Akt fosforilada en los restos S473 y T308, pS6, p4EBP-1 y Ciclina D1. El compuesto de la invención es más fuerte inhibiendo la señalización de mTOR/Akt en comparación con un inhibidor que no es selectivo para mTOR, tal como uno normalmente indicado como inhibidor PanPI3K/mTor. Los tumores extirpados también se sometieron a tinción TUNEL (Figura 12) que muestra muerte celular tumoral después del tratamiento.

Se realizó el mismo experimento con diversos otros modelos de tumores, incluyendo el NSCLC (cáncer de pulmón no microcítico) inducido por células tumorales A549, cáncer de mama inducido por células tumorales ZR-75-1 y RCC (carcinoma de células renales) inducido por células tumorales 786-O. Las Figuras 11B-11D indican que la eficacia del compuesto de la invención en el tratamiento de todos estos tumores se vuelve detectable tan pronto como al cabo de una semana después del tratamiento. El efecto de reducción en el tamaño del tumor en todos los casos dura al menos 1 mes.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la siguiente estructura:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable de la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento del cáncer.

15 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento del cáncer.

5. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4,

20 en el que el cáncer es fibrosarcoma, cáncer pancreático, cáncer renal, cáncer de hígado, melanoma, cáncer nasofaríngeo, cáncer gástrico, cáncer de ovario, leucemia, mieloma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer uterino, cáncer de vejiga, mesotelioma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello y cáncer de cuello uterino.

25 6. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer renal.

30 7. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es carcinoma de células renales.

35 8. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de mama.

9. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer uterino.

40 10. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de vejiga.

45 11. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer colorrectal.

50 12. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón.

13. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón no microcítico.

55

14. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de pulmón microcítico.
- 5 15. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es glioblastoma.
- 10 16. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es un cáncer ginecológico.
- 15 17. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer de cuello uterino.
- 20 18. El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable para uso de la reivindicación 3, o composición farmacéutica para su uso de la reivindicación 4, en el que dicho cáncer es cáncer gástrico.

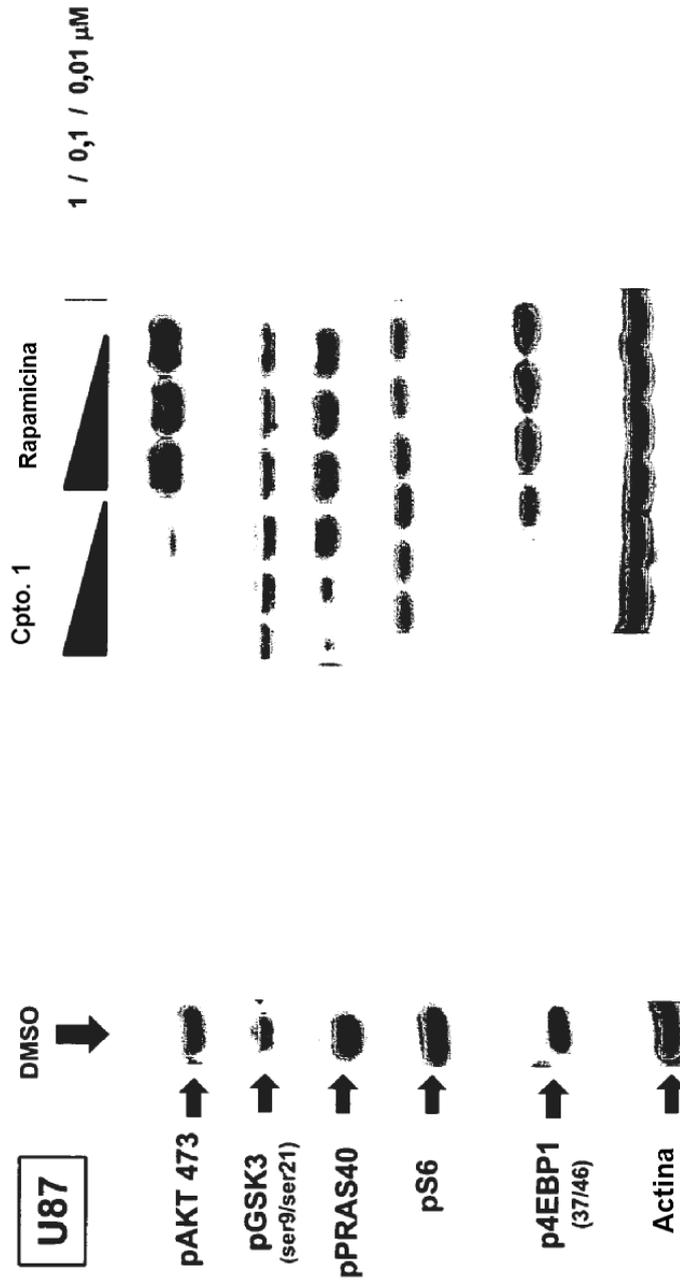
Figura 1 A

Cáncer humano	Líneas de células	Fármacos positivos	Cl <sub>50</sub> (μM)	
			Fármaco positivo	Compuesto objeto
Fibrosarcoma	HT-1080	Doxorrubicina	+++	+++
Cáncer pancreático	MIAPACA-2	5-FU	+	+++
	Bx-PC-3		++	++++
	PANC-1		+	-
Cáncer de riñón	786-O	Cisplatino	+++	+++
Cáncer de hígado	Hep3B	Cisplatino	++	+++
	HepG2		++	++
	SK-HEP-1		+++	+++
	143b		+++	+++
Osteosarcoma	A375	Doxorrubicina	++	+++
Melanoma	SK-MEL-5		++	+++
Nasofaríngeo	CNE2	Cisplatino	++	++
Cáncer gástrico	MCG803		++	+++
	BGC823		++	+++
Cáncer de ovarios	SKOV3	Cisplatino	+	++
	OVCAR3		+	+++
LMC	K562	Cisplatino	+	+++
Cáncer oral	KB		+	+++
Mieloma múltiple ortotópico	RPM-8226	Cisplatino	+	+++
			+	++++

Figura 1 B

Cáncer humano	Líneas de células	Fármacos positivos	CI <sub>50</sub> (μ M)	
			Fármaco positivo	Compuesto objeto
Cáncer de mama	BT474	Doxorrubicina	++	++++
	MCF-7	Cisplatin	+	++++
Cáncer de mama	MCF-7-218	Doxorrubicina	+++	+++
	MCF-7-FL		+++	++++
	MDA-MB231	+	++++	
	SKBR3	Cisplatino	++	+++
Cáncer de próstata	DU-145	Cisplatino	++	++
	LNCaP		+	++
	PC-3	Paclitaxel	+	++++
	Colo205	Irinotecán	++	+++
Cáncer colorrectal	DLD-1	Cisplatino	++	++++
	HCT-116		+++	+++
	HT-29	Cisplatino	+	+++
	LoVo		++	+++
Cáncer de pulmón	SW620	Cisplatino	+	++++
	A549		++	+++
	Calu-6	Cisplatino	++	+++
	NCI-H226		++	++++
Glioblastoma	NCI-H460	Cisplatino	++	++
	SK-MES-1		+	+++
	U87MG	Cisplatino	++	+++

Figura 2



• Los inhibidores de mTORC1/2 inhiben pAKT473 y aguas abajo de mTor pS6 y p4EBP1  
 • La rapamicina activa pAKT473 mediante el bucle de retroalimentación negativa.  
 • La rapamicina no inhibe p4EBP1 ni tampoco los inhibidores de mTORC1/2 .

Figura 3 A

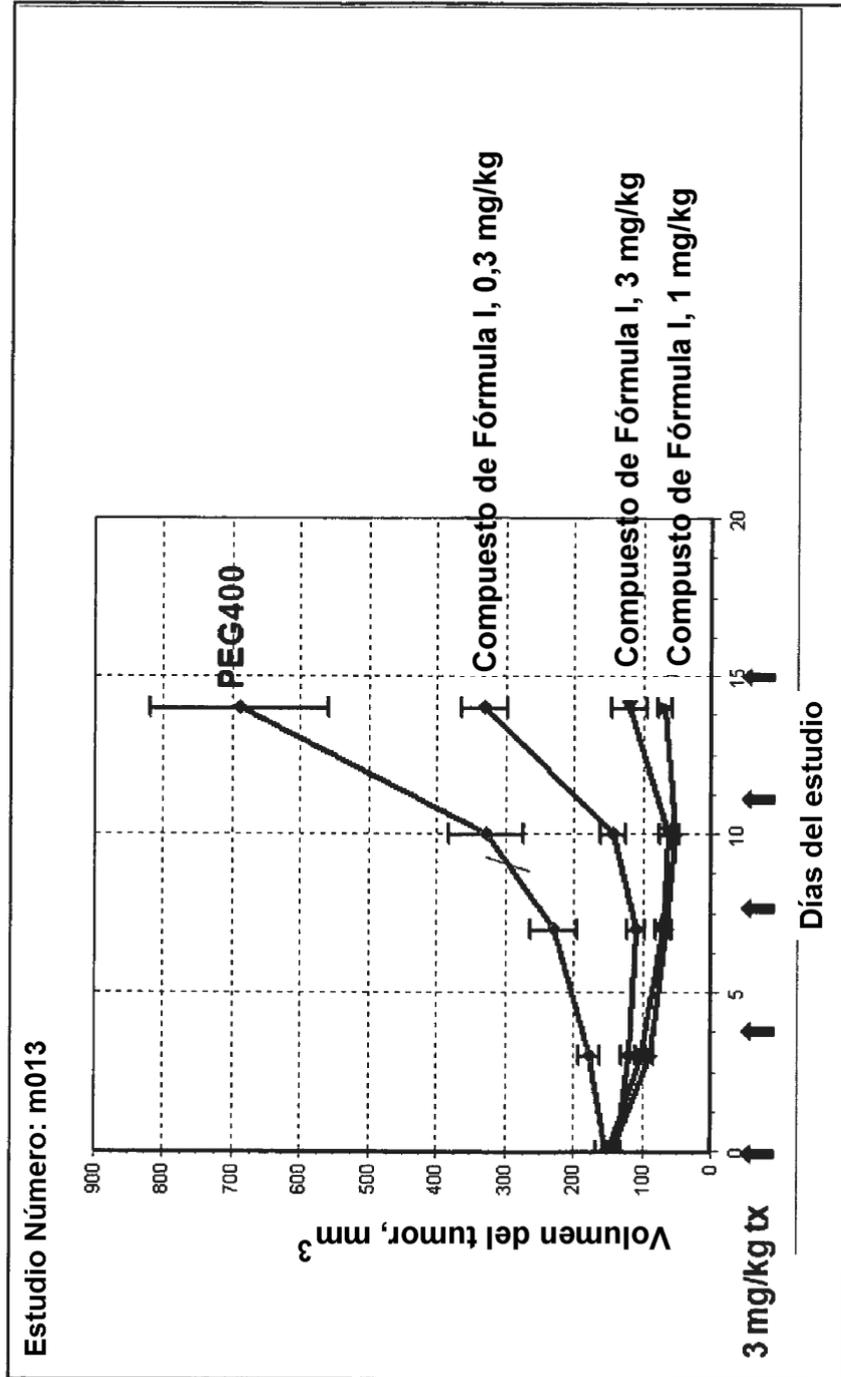


Figura 3 B

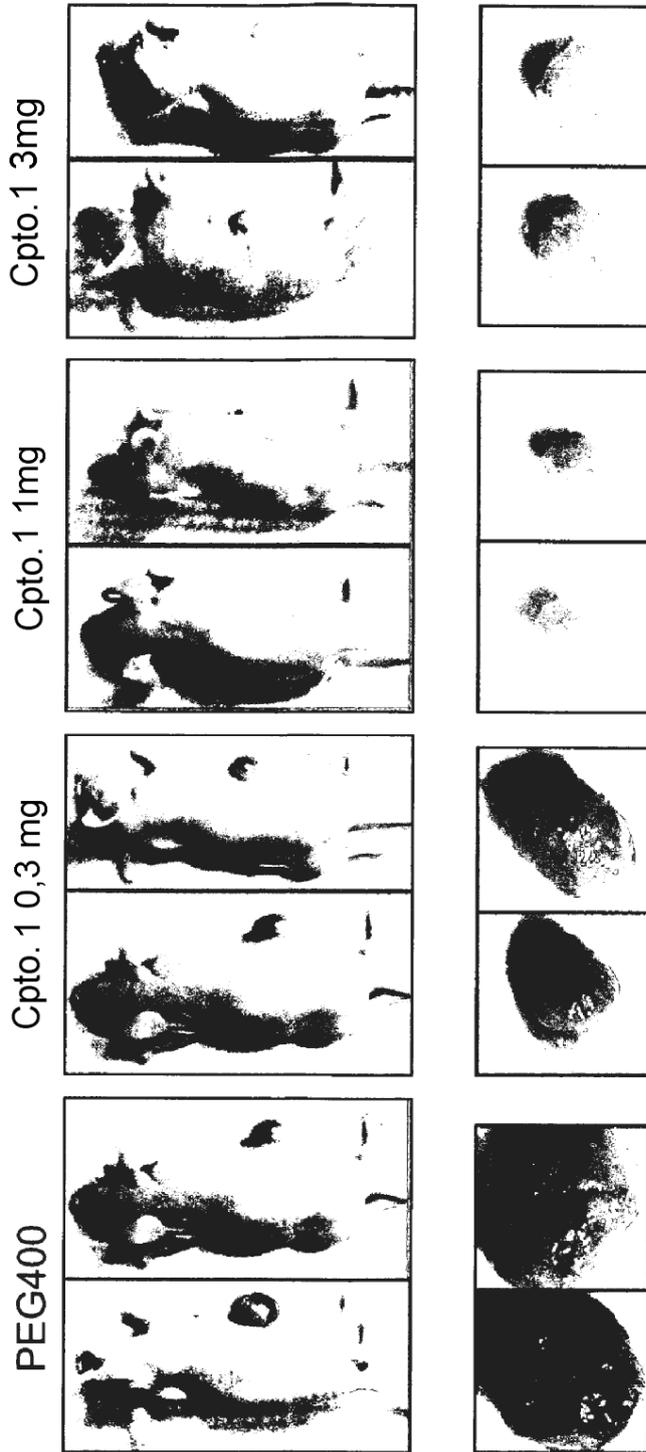


Figura 3 C

Estudio Número: m013

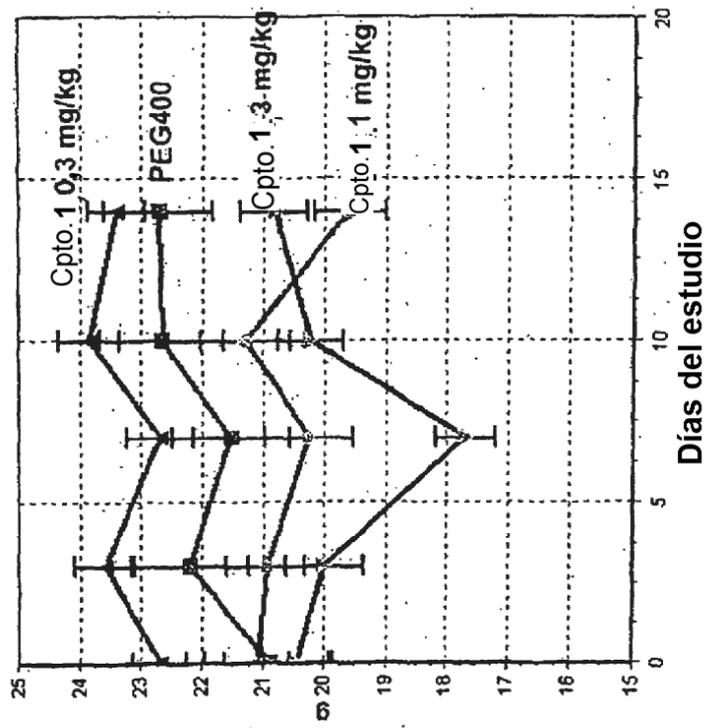


Figura 4 A

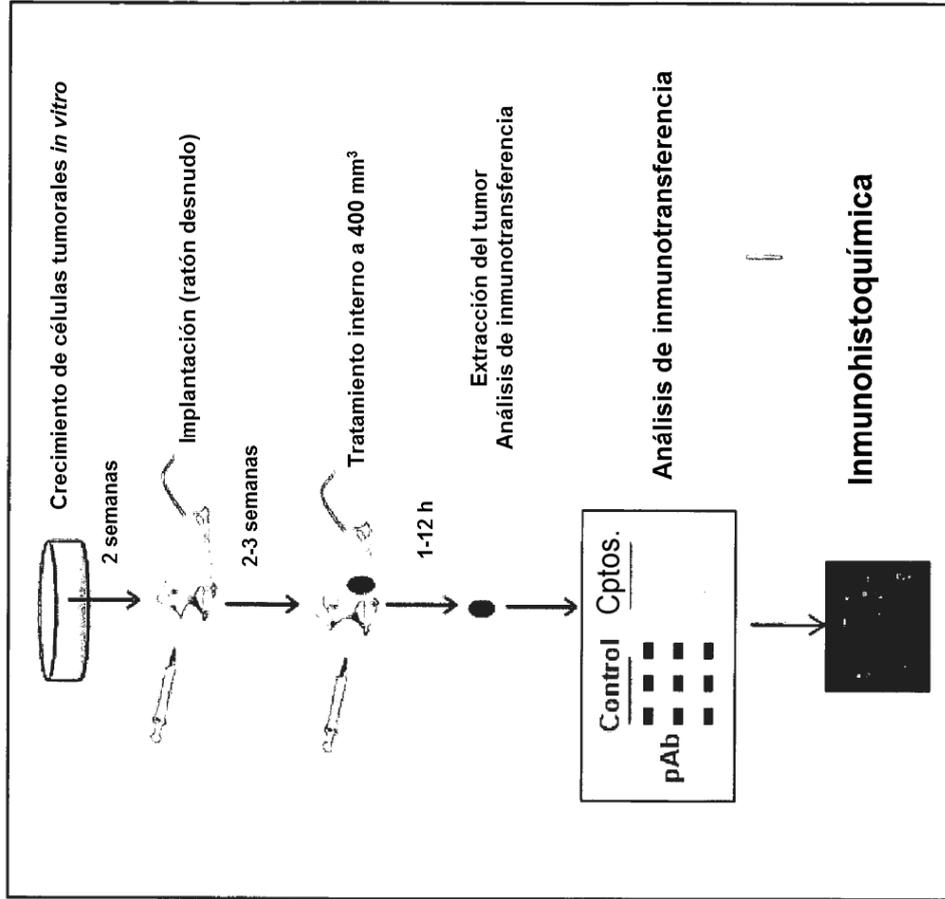


Figura 4 B

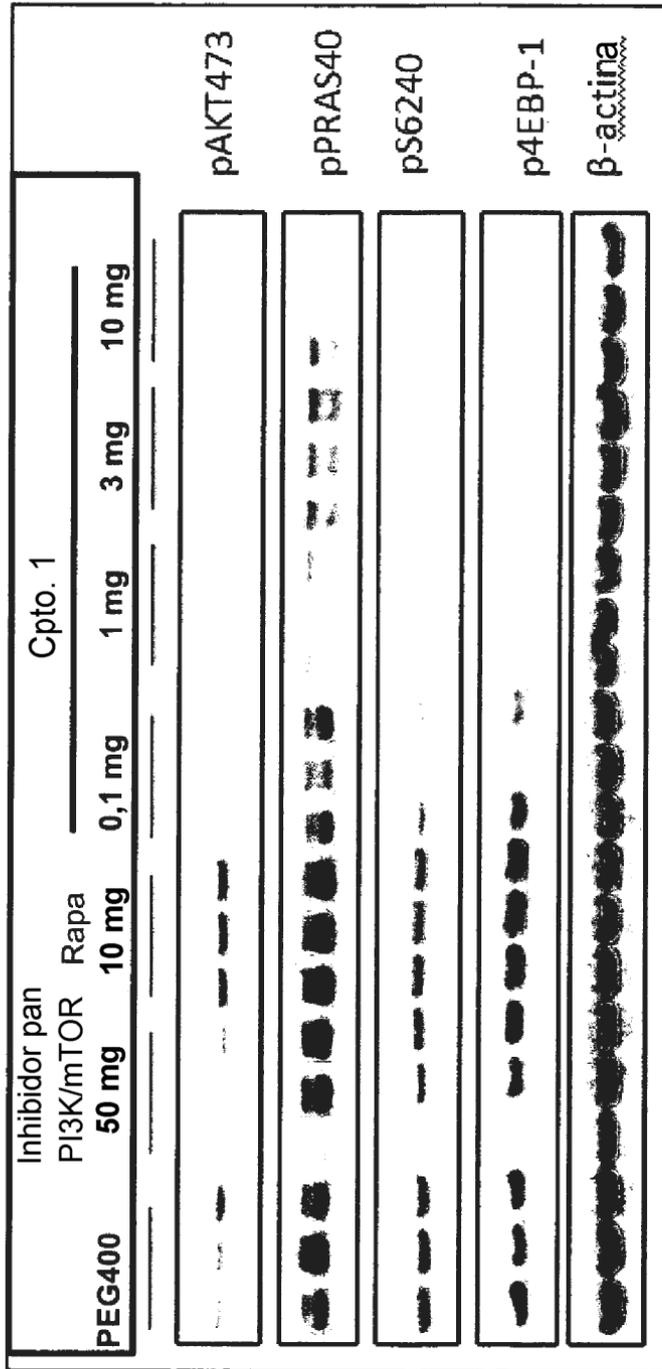


Figura 5

Selectividad de lípido quinasas					
CI <sub>50</sub> (nM)					
PI3K Clase I*	PI3-Quinasas de Clase II**	PI3K Clase III***	PI4K**	PIKK***	
mTOR PI3Kα PI3Kβ PI3Kγ PI3Kδ	PI3KC2α PI3KC2β	VPS34	PI4Kα PI4Kβ	DNA-PK	
>1,0 >200 >5000 >200 >150	>100 >1000	>1000	>1000 >1000	10	
Selectividad de proteína quinasas					
% de inhibición @ 1μM					
> 90 %	0	8			
65 % ~ 90 %	8	15			

Figura 6

<b>Datos celulares</b>	
<b>Proliferación de células PC3 (CI<sub>50</sub>)</b>	<b>3 nM</b>
<b>Activación de pAKT celular en PC3 (CI<sub>50</sub>)</b>	<b>&lt; 10nM</b>
<b>Inhibición de la proliferación de líneas celulares primarias derivadas de 30 pacientes (CI<sub>50</sub> promedio)</b>	<b>18 nM</b>
<b>Sangre entera humana Cambio de CI<sub>50</sub> de pAKTI*</b>	<b>&lt; 2X</b>

Figura 7

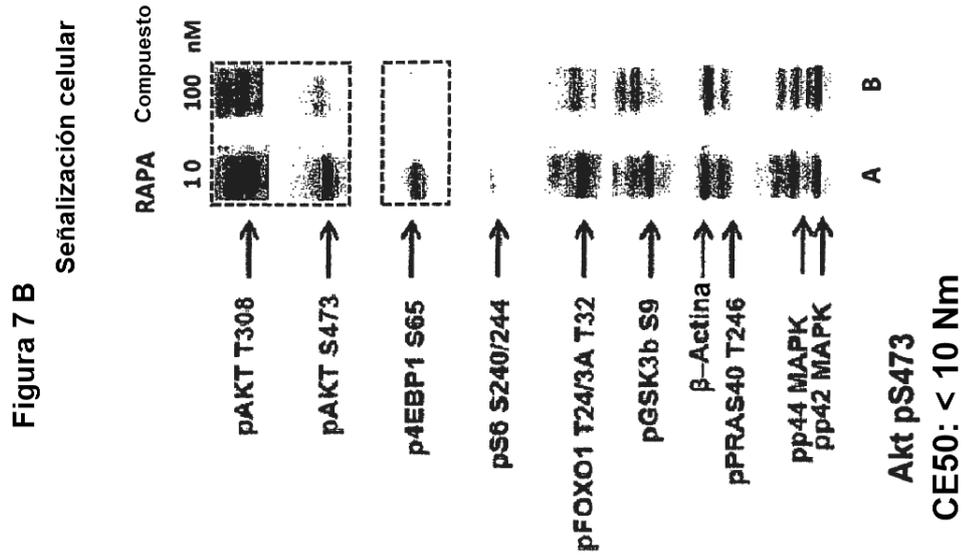
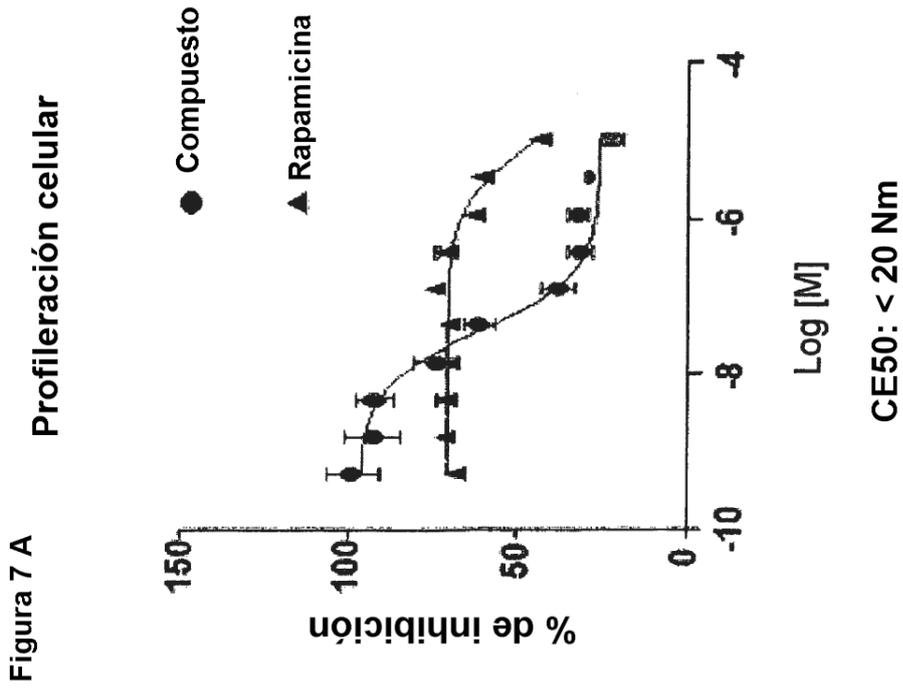
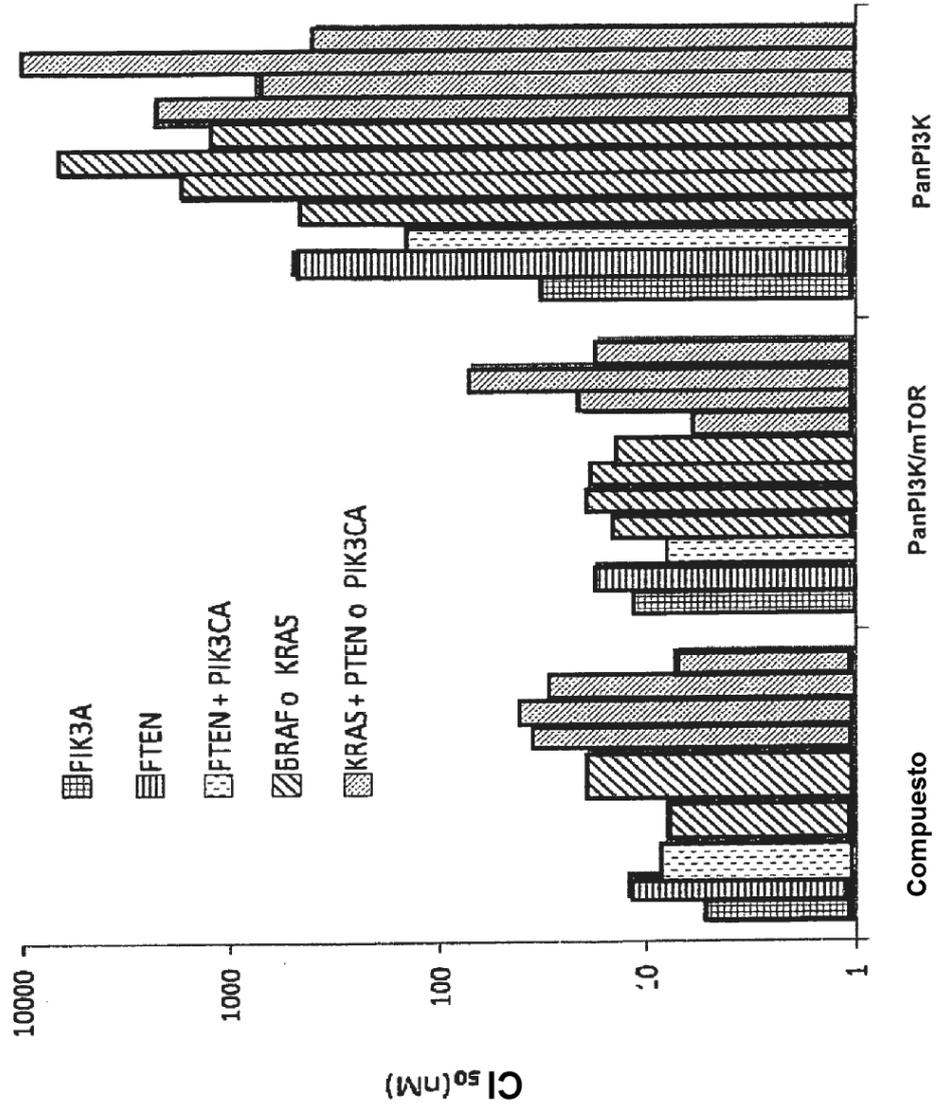


Figura 8 A

Tipo de tejido	Líneas celulares	Compuesto CI <sub>50</sub> (nM)	Mutaciones
<b>Colon</b>	SW620	1	KRAS G12V
	DLD-1	1	PI3KCA E545K, KRAS G13D
	LoVo	35	KRAS G13D
	Colo205	19	BRAF V600E
	HCT-116	11	PI3KCA H1047R, KRAS G13D
	HT-29	905	PI3KCA P449T, BRAF V600E
	NCI-H226	5	
	SK-MES-1	42	
	A549	8	KRAS G12S
	Calu-6	41	KRAS Q61K
<b>Pulmón</b>	NCI-H460	310	PI3KCA E545K, KRAS Q61H

Figura 8 B



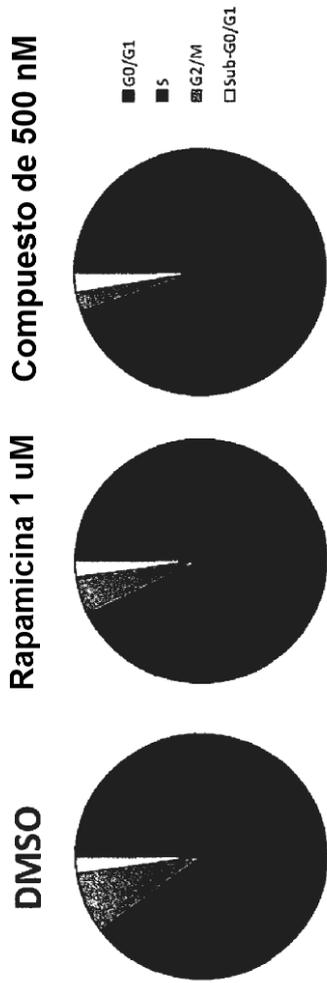


Figura 9 A

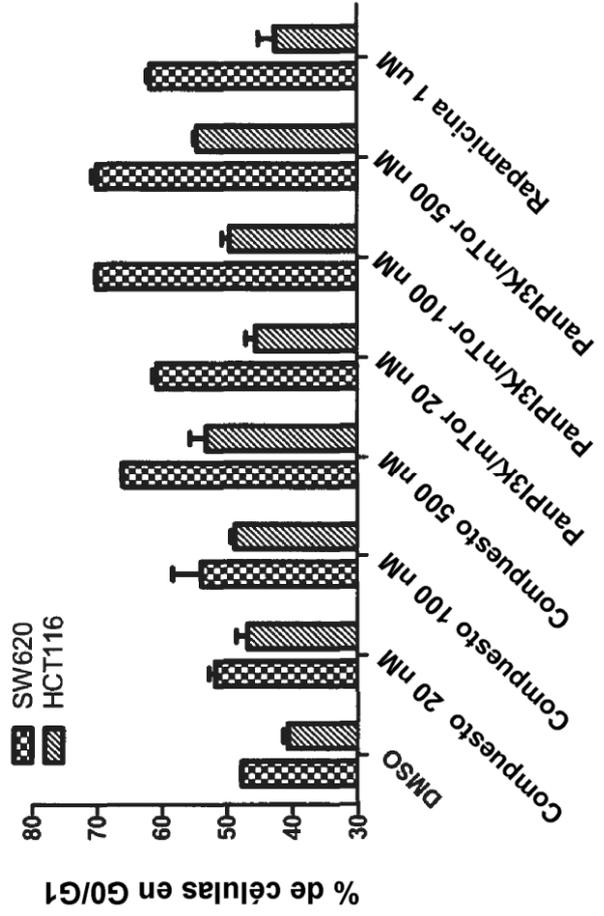


Figura 9 B

Figura 10

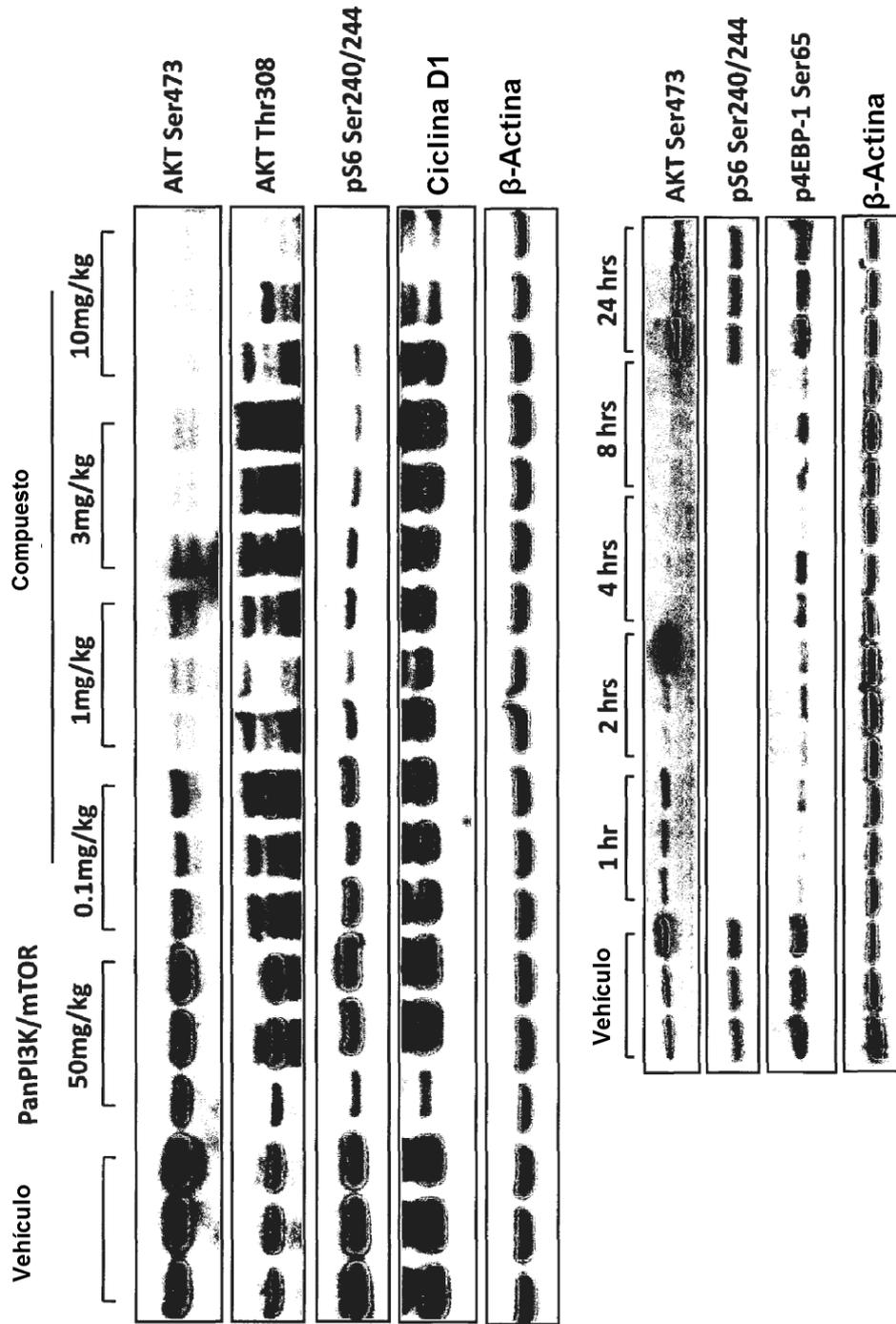


Figura 11A

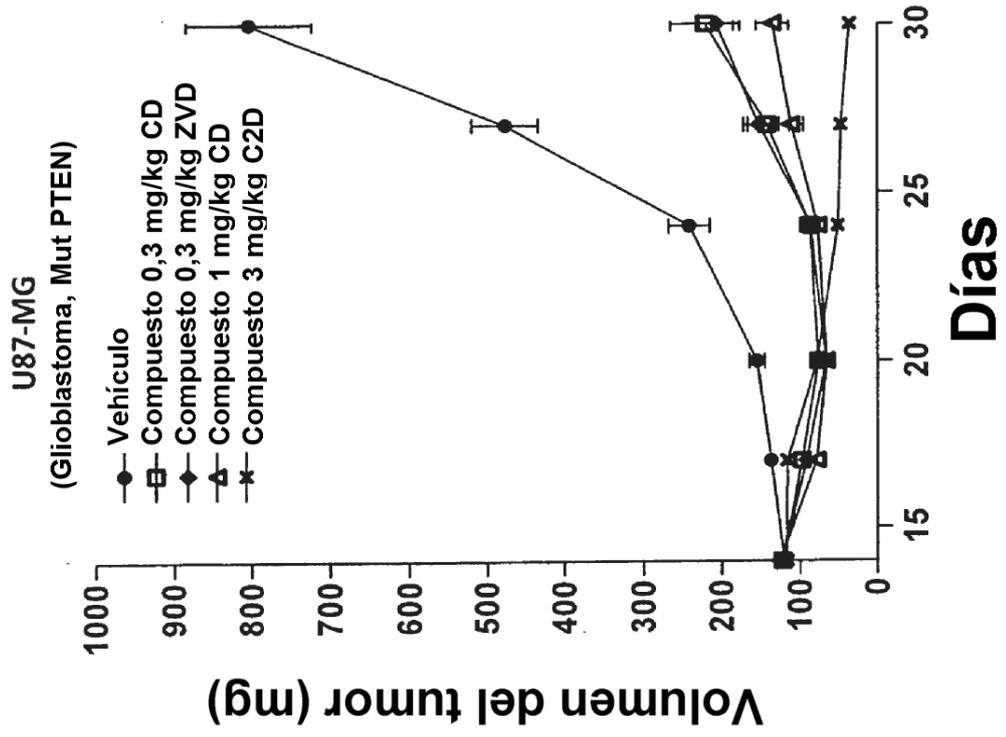
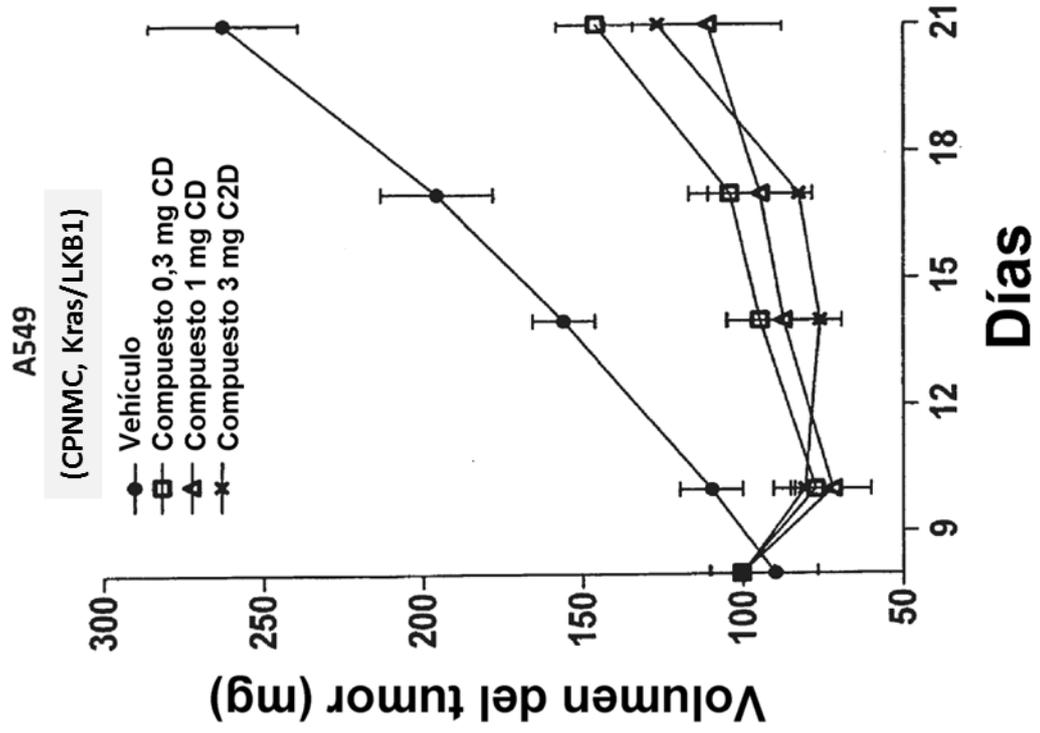


Figura 11B



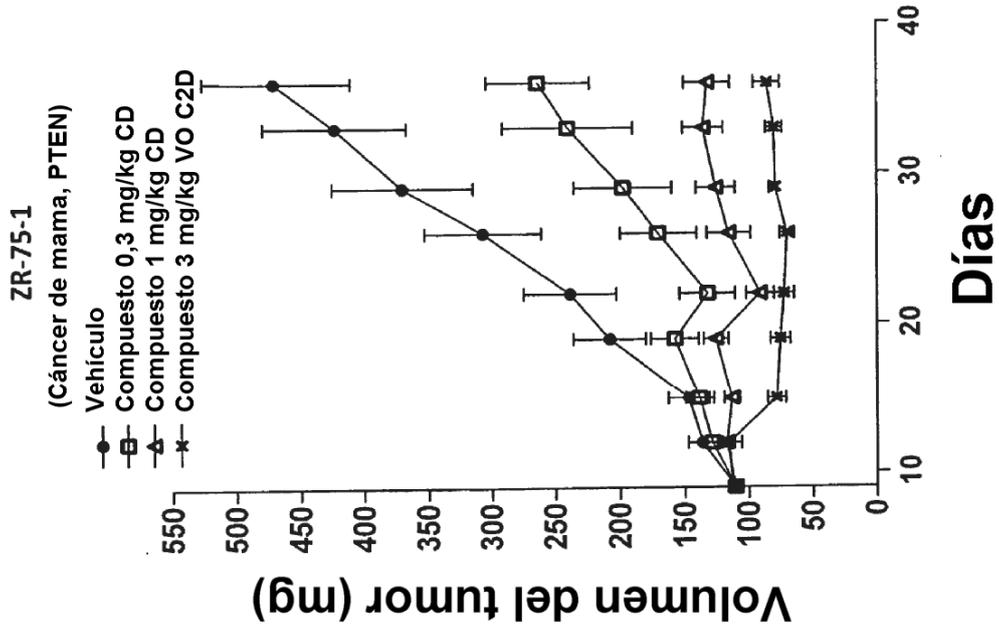


Figura 11C

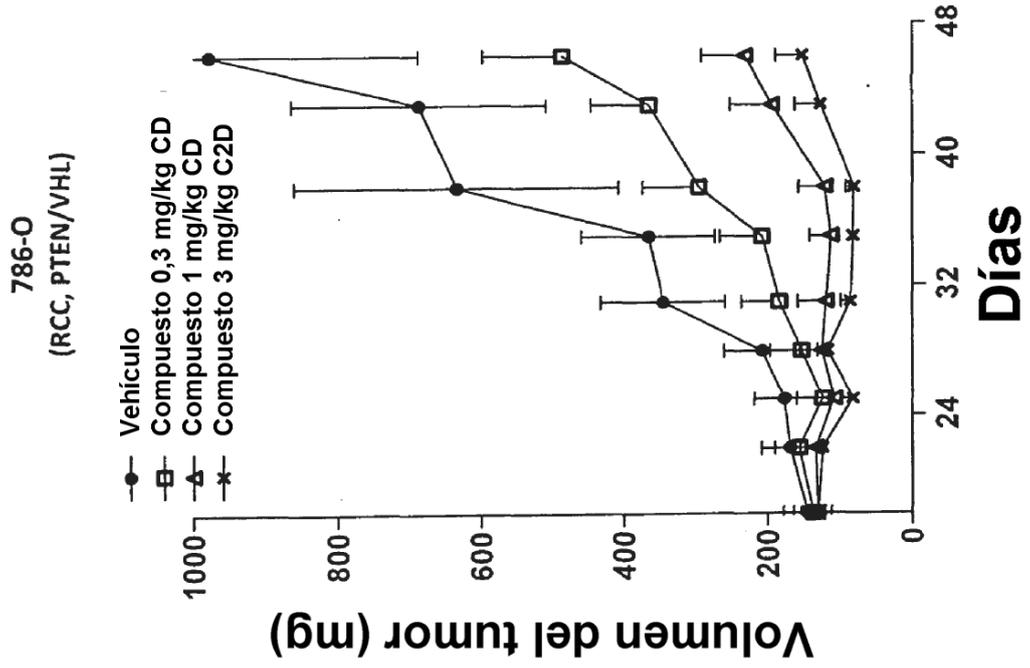


Figura 11D

Figura 12

Glioblastoma U87

