

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 809**

51 Int. Cl.:

A61K 31/517 (2006.01)
C07D 239/70 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/4402 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
A61K 31/4523 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/US2012/031716**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135779**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12764894 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2694073**

54 Título: **Combinaciones de compuestos inhibidores de AKT y MEK para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

01.04.2011 US 201161471038 P

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

07.11.2018

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)
One DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**LEE, BRIAN;
LIN, KUI;
NANNINI, MICHELLE;
PUNNOOSE, ELIZABETH y
SAMPATH, DEEPAK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 688 809 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de compuestos inhibidores de AKT y MEK para tratar el cáncer

5 Prioridad de la invención

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Número 61/471.038, que se presentó el 1 de abril de 2011.

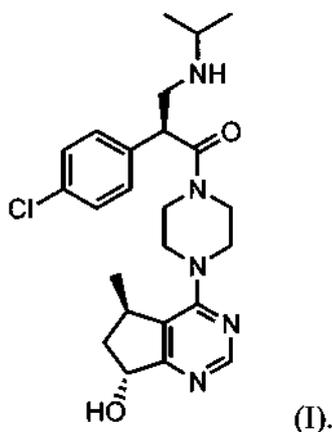
10 Campo de la invención

La invención se refiere en general a combinaciones farmacéuticas de compuestos con actividad contra trastornos hiperproliferativos, tal como cáncer, y que incluye compuestos que inhiben la actividad de AKT cinasa.

Antecedentes de la invención

15 Las proteína cinasas (PK) son enzimas que catalizan la fosforilación de grupos hidroxilo en residuos de tirosina, serina y treonina de proteínas mediante la transferencia del fosfato terminal (gamma) de ATP. A través de las rutas de transducción de señal, estas enzimas modulan el crecimiento, la diferenciación y la proliferación celular, es decir, prácticamente todos los aspectos de la vida celular que de una manera u otra dependen de la actividad de PK (Hardie, G. y Hanks, S. (1995) The Protein Kinase Facts Book. I and II, Academic Press, San Diego, CA). Además, la actividad anormal de PK se ha relacionado con un huésped de trastornos, que van desde enfermedades relativamente no mortales, tales como la psoriasis, a enfermedades extremadamente virulentas, tales como el glioblastoma (cáncer de cerebro). Las proteína cinasas son una clase de dianas importantes para la modulación terapéutica (Cohen, P. (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1: 309).

25 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional Número WO 2008/006040 analiza una serie de inhibidores de AKT, incluyendo el compuesto (S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilamino)propan-1-ona (fórmula I):



30 La Publicación de Solicitud de Patente Internacional Número WO 2010/006225 trata una combinación farmacéutica que comprende un compuesto inhibidor de fosfoinositida 3-cinasa y un compuesto que modula la vía Ras/Raf/Mek para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, especialmente una enfermedad de tumor sólido; una composición farmacéutica que comprende tal combinación; el uso de tal combinación para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa; un envase o producto comercial que comprende tal combinación como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial; y a un método de tratamiento de un animal de sangre caliente, especialmente un ser humano.

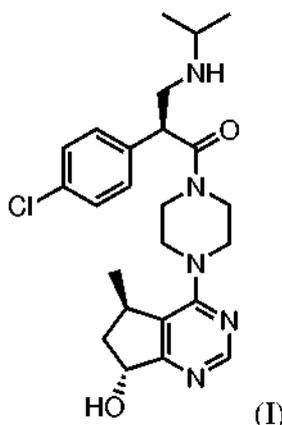
40 Actualmente, sigue existiendo la necesidad de composiciones mejoradas para su uso en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas tales como el cáncer.

Sumario de la invención

45 Se ha determinado que se pueden conseguir efectos aditivos o sinérgicos en la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* e *in vivo* administrando el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con ciertos agentes quimioterapéuticos específicos diferentes. Las combinaciones y métodos pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como cáncer.

50

Un primer aspecto de la invención es una combinación de un compuesto de fórmula I:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de cáncer de colon, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.

10 En una realización de la invención hay una combinación del primer aspecto para su uso de acuerdo con el primer aspecto, en donde el trastorno hiperproliferativo se selecciona de cáncer de colon, melanoma metastásico y cáncer pulmonar no microcítico.

En otra realización de la invención, está la combinación del primer aspecto para su uso de acuerdo con el primer aspecto, en donde:

- 15
- a) el compuesto de fórmula I o la sal del mismo se administra de manera simultánea con el GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
 - b) el compuesto de fórmula I o la sal y el GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de forma secuencial; o
 - 20 c) la administración del GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comienza aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días antes de la administración de la combinación; o
 - d) la administración del compuesto de fórmula I o la sal del mismo comienza aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días antes de la administración de la combinación; o
 - 25 e) la administración del compuesto de fórmula I o la sal del mismo y la administración del GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comienza el mismo día.

En determinadas realizaciones, el cáncer se asocia con la mutación, la sobreexpresión o la amplificación de AKT.

En determinadas realizaciones, el cáncer se asocia con la mutación de PI3K.

30 En determinadas realizaciones, el cáncer se asocia con la amplificación de Her2/ErbB2.

En determinadas realizaciones, un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en combinación con GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso terapéutico para mejorar la calidad de vida de un paciente tratado para uno de los cánceres seleccionados con GDC-0973.

40 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan una combinación de a) un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y b) GDC-0973 y PD-0325901 para su uso en el tratamiento de uno de los cánceres seleccionados modulados por AKT cinasa.

45 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan un kit que comprende un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un recipiente, y un prospecto o etiqueta que indica la administración del compuesto de fórmula I con GDC-0973 y PD-0325901 para su uso en el tratamiento de uno de los cánceres seleccionados.

50 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan un producto que comprende un compuesto que tiene la fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, GDC-0973 y PD-0325901; como una preparación combinada para uso separado, simultáneo o secuencial en el tratamiento de uno de los cánceres seleccionados.

Se observa sinergia/aditividad cuando la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 se dosifica en muchos tipos celulares que incluyen líneas celulares de melanoma, cáncer de pulmón, de colon, de ovario, renal, de mama, de próstata y de páncreas *in vitro*, y estos hallazgos se han confirmado *in vivo* en modelos de xenoinjerto de melanoma, de colon y de pulmón. Se observa sinergia en los tipos tumorales dirigidos mediante Ras/Raf o ambas activaciones de la vía. Las líneas de melanoma, cáncer pulmonar (por ejemplo, NSCLC) y de colon muestran sinergia cuando se administra la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 en varias células. Las células de cáncer de mama (incluyendo los cánceres de mama luminal (ER+), Her2+ y basal triple negativo) también pueden demostrar sinergia cuando se administra la combinación de GDC-0068 y GDC-0973. Se observa sinergia incluso en células sensibles solo a Meki cuando se administra la combinación de GDC-0068 y GDC-0973.

Se ha descubierto que el estado de la mutación de la célula cancerosa es un biomarcador de cómo responderá la célula cancerosa a diferentes protocolos del tratamiento. Por ejemplo, las células cancerosas que tienen mutaciones en la vía de PI3K (por ejemplo, PI3K o AKT) en combinación con mutaciones Kras y/o Braf pueden presentar respuestas positivas (por ejemplo, sinérgicas) a los tratamientos de combinación descritos en el presente documento. Además, el estado de PTEN de la célula de cáncer también es un biomarcador.

Se ha visto una fuerte sinergia con la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 en el modelo de melanoma A2058 (mutante PTEN null/Braf). La inhibición del crecimiento tumoral (TGI, del inglés *tumor growth inhibition*) del agente único comparable se ha visto con todas las dosis de GDC-0973 y dosis más altas de GDC-0068 (75 y 100 mg/kg). No se ha visto TGI con 50 mg/kg de GDC-0068. La combinación de ambos fármacos se toleró bien en este modelo, con una pérdida de peso máxima de aproximadamente el 13 %.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 (2,5 mg/kg) sobre volúmenes tumorales.

La figura 2 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 (5,0 mg/kg) sobre volúmenes tumorales.

La figura 3 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 (7,5 mg/kg) sobre volúmenes tumorales.

La figura 4 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a líneas celulares de cáncer colorrectal *in vitro*.

La figura 5 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a HCT-116 (mutante de PI3K y Kras de colon). Se presentan los mapas de calor en dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad de las células en células HCT-116. Las concentraciones en aumento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y. Se presentan mapas de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) a la derecha que indican el porcentaje de inhibición de cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973 bien en combinación o como agentes únicos; el control expuesto al vehículo (DMSO) se establece a 0. Las puntuaciones BLISS se calculan para cada par de dosis y los mapas de calor se muestran a la izquierda.

La figura 6 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a las líneas celulares de NSCLC *in vitro*.

La figura 7 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a H2122 (mutante de Kras en NSCLC). Se muestran mapas de calor en dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad de las células en células NCI-H2122. Las concentraciones en aumento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y. Se muestran mapas de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) a la derecha, que indican el porcentaje de inhibición a cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973 bien en combinación o como agentes únicos; el control expuesto al vehículo (DMSO) se establece a 0. Las puntuaciones BLISS se calculan para cada par de dosis y los mapas de calor se muestran a la izquierda.

La figura 8 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a líneas celulares de melanoma *in vitro*.

La figura 9 ilustra los resultados del agente único y de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a A2058 (mutante PTEN -/- y Braf en melanoma). Se presentan mapas de calor de dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad en células A2058. Las puntuaciones BLISS se calculan para cada par de dosis y los mapas de calor se muestran a la izquierda. Las concentraciones en aymento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y. Se muestran mapas de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) a la derecha que indican el porcentaje de inhibición a cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973 bien en combinación o como agentes únicos; el control expuesto al vehículo se (DMSO) se establece a 0.

La figura 10 ilustra una atenuación génica mejorada de las actividades de la vía de AKT y MEK en comparación con los agentes únicos.

La figura 11 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0973 y GDC-0068 frente a la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-468.

La figura 12 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a líneas celulares de cáncer de mama *in vitro*.

La figura 13 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente al cáncer de ovario.

La figura 14 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a líneas celulares de cáncer de próstata *in vitro*.

La figura 15 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de mama MX-1.

La figura 16 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de NSCLC H2122.

La figura 17 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de páncreas SW1990.

La figura 18 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de páncreas PaTu-8902.

La figura 19 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de melanoma 537Mel.

La figura 20 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de melanoma A2058.

La figura 21 ilustra los resultados de la combinación de GDC-0068 dosificado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores colorrectales HCT-116.

Las figuras 22a-22b muestran los resultados de la inhibición de viabilidad celular de diversas líneas celulares comparando las terapias de agente único y de combinación. La potencia de las células de GDC-0068 se correlacionó con la activación de Akt resultante de alteraciones en PI3K/PTEN/HER2, mientras que la potencia de las células de GDC-0973 se correlacionó con la activación de MEK que resulta de las mutaciones RAS o B-RAF. Las líneas celulares sensibles a GDC-0068 y a GDC-0973 a menudo son mutuamente excluyentes. Aproximadamente un tercio de las líneas celulares ensayadas mostró resistencia a ambos agentes (véase la Figura 22a-22b). La combinación de GDC-0068 y GDC-0973 dio como resultado una inhibición mejorada de la viabilidad celular en comparación con cualquiera de los agentes únicos por separado en la mayoría de las líneas celulares ensayadas. Los efectos de combinación se evaluaron usando el modelo de independencia BLISS (Lehar et al. 2007).

El gráfico superior de la Figura 22a ilustra las CI50 del agente único para GDC-0068 y GDC-0973 en múltiples líneas celulares de cáncer. Las células se trataron bien con GDC-0068 o con GDC-0973 o en combinación en RPMI + FBS al 10 % a concentraciones en aumento y se ensayó la viabilidad tras 4 días usando CelTiter-Glo. El correspondiente gráfico inferior ilustra la sinergia de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 para los varios genotipos específicos. Los bloques de color indican una mutación, delección o activación. Las mutaciones/alteraciones en B-RAF, RAS, HER2, PI3K o PTEN se indican mediante un cuadrado coloreado debajo de cada línea celular (B-RAF, marrón; RAS, rojo; HER2, azul; PTEN, verde oscuro; para PI3K, el verde claro indica mutaciones en el dominio cinasa en PIK3CA, el azul claro indica mutaciones o amplificaciones en el dominio no de cinasa). Las alteraciones de PTEN indican bien una señal no detectable para esta proteína mediante análisis por transferencia de Western o una mutación en el gen. Los orígenes tisulares para cada una de las líneas celulares también se indican en diferentes colores con letras que indican cáncer de mama (Ma), de colon (Col), cáncer de pulmón no microcítico (Pul), melanoma (Me), de ovario (Ov), de próstata (Pr) y renal (Re).

La figura 22b ilustra las puntuaciones positivas totales de Bliss de la combinación para GDC-0068 y GDC-0973 en múltiples líneas celulares. Se observaron efectos sinérgicos en múltiples líneas celulares tal como se indica mediante las puntuaciones positivas totales de BLISS, especialmente en líneas celulares con activación de la vía RAS/RAF o en líneas celulares con la activación de ambas vías, PI3K/Akt RAS/RAF.

Las puntuaciones positivas totales de BLISS se calcularon a partir de la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 en cada línea celular.

La figura 23 ilustra el mapa de calor de Bliss y el % de inhibición para GDC-0068 y GDC-0973 en melanoma 537MEL, PTEN null, Braf amp/del; la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 inhibe ambas vías y aumenta la muerte celular.

La figura 24 ilustra el análisis por transferencia de Western para la línea celular de colon humano HTC116 tratada con GDC-0068 y GDC-0973 durante 24 horas. Las células HCT-16 se incubaron con GDC-0068 y GDC-0973 a las concentraciones especificadas durante aproximadamente 3 horas.

La fosforilación de Akt, MEK y sus marcadores aguas abajo se analizaron mediante análisis por transferencia de Western.

La figura 25 ilustra que la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 aumenta la eficacia en melanoma 537MEL, PTEN null, Braf amp/del.

La figura 26 ilustra los cambios significativos en los niveles de expresión de fosfoproteína frente al control del vehículo para la combinación de GDC-0068 y GDC-0973. Los tumores A2058x1 se recolectaron 3 horas después de que a los ratones se les administrase una única dosis de GDC-0068 a 100 mg/kg o de GDC-0973 a 7,5 mg/kg o la combinación. Los tumores se analizaron usando la matriz proteínica de fase inversa (RPPA).

La figura 27 ilustra los cambios significativos en los niveles de expresión de fosfoproteína para la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 frente a cualquier agente único en tumores de xenoinjertos A2058 tras la administración.

La figura 28 ilustra mapas de calor de dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad de las células en células MALME3M. Las concentraciones en aumento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y. El mapa de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) muestra el % de inhibición a cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973 bien en combinación o como agentes únicos; el control se expuso al vehículo (DMSO) y se estableció a 0.

La figura 29 ilustra mapas de calor de dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad celular en células MALME3. Las concentraciones en aumento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y.

5 El mapa de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) muestra el % de inhibición a cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973, bien en combinación o como agentes únicos; el control se expuso al vehículo (DMSO) y se estableció a 0. Se calcularon las puntuaciones BLISS para cada par de dosis y los mapas de calor se muestran a la derecha.

10 La figura 30 ilustra mapas de calor de dos dimensiones (2D) que muestran los efectos de la combinación sobre la viabilidad celular en células NCI-BL2122. Las concentraciones en aumento de GDC-0068 se muestran sobre el eje x y las concentraciones en aumento de GDC-0973 se indican sobre el eje y.

El mapa de calor del porcentaje de inhibición (% de inhibición) muestra el % de inhibición a cada concentración de GDC-0068 y GDC-0973, bien en combinación o como agentes únicos; el control se expuso al vehículo (DMSO) y se estableció a 0. Se calcularon las puntuaciones BLISS para cada par de dosis y los mapas de calor se muestran a la derecha.

15 La figura 31 muestra los cambios en los niveles de expresión de fosfoproteína (24 horas) y la modulación de las vías AKT y MEK con la combinación de GDC-0068 y GDC-0973. Los tumores A2058x1 se recolectaron 24 horas después de que se les administrase a los ratones una dosis única de GDC-0068 a 100 mg/kg o GDC-0973 a 7,5 mg/kg, o la combinación. Los tumores se analizaron usando la matriz proteínica de fase inversa (RPPA).

20 Descripción detallada de realizaciones a modo de ejemplo y definiciones

Las palabras "comprender", "que comprende", "incluir", "que incluye" e "incluye" cuando se usan en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones, pretenden especificar la presencia de características, números enteros, componentes o etapas que se indican, pero no excluyen la presencia o adición de una o más características, números enteros, componentes, etapas diferentes o grupos de los mismos.

30 Las expresiones "tratar" y "tratamiento" se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado, tal como el crecimiento, el desarrollo o la diseminación del cáncer. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, el retraso o la desaceleración del avance de la enfermedad, la mejora o la paliación de la patología, y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la afección o el trastorno, así como los que son propensos a tener la afección o trastorno o aquellos en los que se debe prevenir la afección o trastorno.

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

50 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas ("NSCLC"), adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello. El cáncer gástrico, como se utiliza en el presente documento, incluye cáncer de estómago, que puede desarrollarse en cualquier parte del estómago y puede propagarse por todo el estómago y a otros órganos; particularmente el esófago, los pulmones, los ganglios linfáticos y el hígado.

65 Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto biológico (molécula grande) o químico (molécula pequeña) útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción.

Un "agente de platino" es un agente quimioterapéutico que comprende platino, por ejemplo, carboplatino, cisplatino y oxaliplatino.

5 El término "mamífero" incluye, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, cobayas, monos, perros, gatos, caballos, vacas, cerdos, ovejas y aves de corral. El término paciente se refiere a un mamífero, y en una realización, el paciente es un ser humano.

10 El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias relativas al uso de dichos productos terapéuticos.

15 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto de la invención. Las sales a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, sales sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato de ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato de ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato "mesilato", etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato, y pamoato (es decir, 1,1'-metileno-bis -(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ión acetato, un ión succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que establezca la carga en el precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que múltiples átomos cargados son parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

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

40 La expresión "farmacéuticamente aceptable" indica que la sustancia o composición debe ser compatible química y/o toxicológicamente, con los demás ingredientes que comprenden una formulación, y/o el mamífero que se trata con la misma.

45 El término "sinérgico", como se usa en el presente documento, se refiere a una combinación terapéutica que es más eficaz que los efectos aditivos de los dos o más agentes únicos. Una determinación de una interacción sinérgica entre un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno de GDC-0973 y PD-0325901 puede basarse en los resultados obtenidos a partir de los ensayos descritos en el presente documento. Los resultados de estos ensayos pueden analizarse usando el método de combinación de Chou y Talalay y el análisis del efecto de la dosis con el software CalcuSyn para obtener un índice de combinación (Chou y Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22: 27-55). Las combinaciones proporcionadas por esta invención se han evaluado en varios sistemas de ensayo, y los datos se pueden analizar utilizando un programa estándar para cuantificar sinergia, aditivismo y antagonismo entre agentes anticancerosos. Un programa de ejemplo es el descrito por Chou y Talalay, en "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, Capítulo 2. Los valores del Índice de Combinación inferiores a 0,8 indican sinergia, los valores superiores a 1,2 indican antagonismo, y los valores entre 0,8 a 1,2 indican efectos aditivos. La terapia de combinación puede proporcionar "sinergia" y demostrar "sinérgica", es decir, el efecto alcanzado cuando los principios activos usados juntos es superior a la suma de los efectos que resultan del uso separado de los compuestos. Puede alcanzarse un efecto sinérgico cuando los principios activos están: (1) co-formulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) suministrados de forma alterna o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) por algún otro régimen. Cuando se suministran en terapia de alternancia, puede alcanzarse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante inyecciones diferentes en jeringuillas separadas. En general, durante la terapia de alternancia, se administra una dosificación eficaz de cada principio activo secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, las dosis eficaces de dos o más principios activos se administran juntas. Los efectos de combinación se evaluaron usando tanto el modelo de independencia BLISS como el modelo de agente individual mayor (HSA) (Lehar et al. 2007, Molecular Systems

Biology 3: 80). Las puntuaciones de BLISS cuantifican el grado de potenciación de los agentes individuales y una puntuación de BLISS positiva (mayor de 0) sugiere una aditividad mayor que la sencilla. Una puntuación positiva y acumulativa de BLISS mayor de 250 se considera como una sinergia fuerte observada en los intervalos de concentración ensayados. Una puntuación de HSA (mayor de 0) sugiere un efecto de combinación mayor que el máximo de las respuestas del agente individual a las concentraciones correspondientes.

Se conocen en la técnica métodos de medición de la TGI. En un método de ejemplo, se determinan y se comparan los volúmenes tumorales medios del paciente antes y después del tratamiento. Los volúmenes tumorales se pueden medir en dos dimensiones (longitud y ancho) usando cualquier método en la técnica, por ejemplo, calibradores UltraCal IV (Fred V. Fowler Company) o por PET (tomografía por emisión de positrones), o por algún otro método. Se puede utilizar la fórmula volumen tumoral (mm^3) = (longitud x anchura²) x 0,5. La medición de volúmenes tumorales a lo largo de múltiples períodos de tiempo puede realizarse usando un procedimiento de efectos mixtos lineales (LME) de modelado mixto (Pinheiro et al., 2009). Este procedimiento puede abordar tanto mediciones repetidas (como múltiples pacientes). Pueden usarse splines de regresión cúbica para ajustar un perfil no lineal a los transcurros de tiempo del volumen tumoral en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales pueden relacionarse entonces con una dosis dentro del modelo mixto. La inhibición del crecimiento tumoral como porcentaje del vehículo se puede calcular como un porcentaje de área bajo la curva ajustada (AUC) por día en relación con el vehículo, usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de TGI} = 100 \left[1 - \left(\frac{\text{AUC}_{\text{tratamiento}} / \text{día}}{\text{AUC}_{\text{vehículo}} / \text{día}} \right) \right]$$

Utilizando esta fórmula, un valor de TGI del 100 % indica estasis tumoral, más de aproximadamente el 1 %, pero menos de aproximadamente el 100 % indica la inhibición del crecimiento tumoral, y más de aproximadamente el 100 % indica una regresión tumoral.

PREPARACIÓN DE UN COMPUESTO DE FÓRMULA I

El compuesto de fórmula I y las sales del mismo se pueden preparar tal como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Número WO 2008/006040 o tal como se describe en el Ejemplo 1 a continuación. En la preparación de los compuestos de Fórmula I, puede ser necesaria la protección de las funcionalidades remotas de los intermediarios (por ejemplo, aminas primarias o secundarias, etc.). La necesidad de tal protección variará dependiendo de la naturaleza de la funcionalidad remota y de las condiciones de los métodos de preparación. Los grupos protectores de aminas (NH-Pg) incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxycarbonilo (CBz) y 9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). La necesidad de tal protección se determina fácilmente por un experto en la materia. Para una descripción general de los grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Nueva York, 1991.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN

En cualquiera de los métodos sintéticos para preparar el compuesto de Fórmula I, puede ser ventajoso separar los productos de reacción entre sí y/o de los materiales de partida. Los productos deseados de cada etapa o serie de etapas se separan y/o se purifican hasta el grado deseado de homogeneidad mediante las técnicas comunes en la técnica. Normalmente, tales separaciones implican extracción multifásica, cristalización en un disolvente o mezcla de disolventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede implicar cualquier número de métodos incluyendo, por ejemplo: de fase inversa y fase normal; exclusión de tamaño; intercambio iónico; métodos y aparatos de cromatografía líquida de alta, media y baja presión; analítica a pequeña escala; lecho móvil simulado (SMB) y cromatografía preparativa de capa fina o gruesa, así como técnicas de cromatografía de capa fina y ultrarrápida a pequeña escala.

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

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

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

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

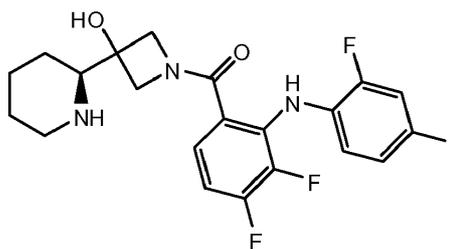
En el método (1), se pueden formar sales diastereoméricas por reacción de bases quirales enantioméricamente puras, tales como brucina, quinina, efedrina, etricnina, α -metil- β -feniletilamina (anfetamina), y similares, con compuestos asimétricos que llevan una funcionalidad ácida, tales como ácido carboxílico y ácido sulfónico. Las sales diastereoméricas pueden inducirse a separarse por cristalización fraccional o cromatografía iónica. Para la separación de los isómeros ópticos de compuestos amino, la adición de ácidos carboxílicos o sulfónicos quirales, tales como ácido canforsulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico, o ácido láctico, puede dar lugar a la formación de las sales diastereoméricas.

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

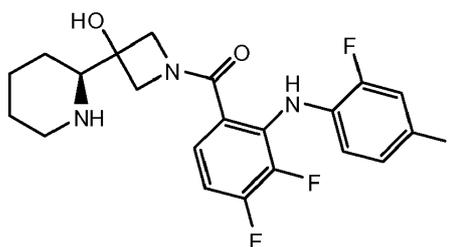
AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Ciertos agentes quimioterapéuticos han demostrado propiedades sorprendentes e inesperadas en combinación con compuestos de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la inhibición de la proliferación de células *in vitro* e *in vivo*. Dichos agentes quimioterapéuticos incluyen GDC-0973 y PD-0325901

GDC-0973, también conocido como XL-518, es un inhibidor selectivo de MEK, también conocido como proteína cinasa cinasa activada por mitógenos (MAPKK), que es un componente clave de la ruta RAS/RAF/MEK/ERK que se activa frecuentemente en tumores humanos. La activación inadecuada de la ruta MEK/ERK promueve el crecimiento celular en ausencia de factores de crecimiento exógenos. Está en curso un ensayo clínico de Fase I que evalúa GDC-0973 para determinar los tumores sólidos. GDC-0973 pueden prepararse como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional Número WO2007044515(A1). GDC-0973 tiene el nombre: (S)-(3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)fenil)(3-hidroxi-3-(piperidin-2-il)azetidín-1-il)metanona, y la siguiente estructura:



5 PD-0325901 (Reg. CAS n.º 391210-10-9, Pfizer) es un inhibidor de MEK alostérico competitivo no ATP de segunda generación para el tratamiento por comprimido oral potencial del cáncer (documentos US 6960614; US 6972298; US 2004/147478; US 2005/085550). Se han realizado ensayos clínicos de Fase II para el tratamiento potencial de tumores de mama, tumores de colon y melanoma. PD-0325901 se denomina como (R)-N-(2,3-dihidroxiopropoxi)-3,4-difluoro-2-(2-fluoro-4-yodofenilamino)benzamida, y tiene la estructura:



10

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen combinaciones del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, GDC-0973, y uno o más vehículos, emolientes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

15

Un ejemplo incluye una primera formulación para administración oral de GDC-0068, o una sal del mismo, y uno o más vehículos, emolientes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables, y una segunda formulación para administración oral de GDC-0973, o una sal del mismo, y uno o más vehículos, emolientes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

20

El compuesto de fórmula I o la una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, GDC-0973, pueden existir en formas no solvatadas, así como en formas solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol, y similares, y se pretende que la invención comprenda tanto las formas solvatadas como las no solvatadas.

25

El compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y GDC-0973 también pueden existir en diferentes formas tautoméricas, y todas estas formas están incluidas dentro del alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautomérica" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles a través de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros de protón (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones a través de la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos de los electrones de enlace.

30

Las composiciones farmacéuticas incluyen tanto la composición en masa como unidades de dosificación individuales comprendidas por más de un agente farmacéuticamente activo (por ejemplo, dos) que incluyen un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y GDC-0973 junto con cualquier excipiente, diluyente, vehículo o emoliente farmacéuticamente inactivo. La composición en masa y cada unidad de dosificación individual pueden contener cantidades fijas de los agentes farmacéuticamente activos mencionados anteriormente. La composición en masa es material que aún no se ha conformado en unidades de dosificación individuales. Una unidad de dosificación ilustrativa es una unidad de dosificación oral tal como comprimidos, píldoras, cápsulas, y similares. De forma análoga, el método de tratamiento de un paciente mediante la administración de una composición farmacéutica de la presente invención, descrito en el presente documento, también pretende que incluir la administración de la composición en masa y unidades de dosificación individuales.

45

Las composiciones farmacéuticas también incluyen compuestos marcados con isótopos que son idénticos a los citados en el presente documento, pero en los que uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra normalmente en la naturaleza. Todos los isótopos de cualquier átomo o elemento en particular tal como se especifica, están contemplados dentro del alcance de los compuestos de la invención, y sus usos. Los isótopos a modo de ejemplo

50

que se pueden incorporar en los compuestos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro y yodo, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I y ^{125}I . Ciertos compuestos de la presente invención marcados con isótopos (por ejemplo, los marcados con ^3H y ^{14}C) son útiles en ensayos de distribución en el tejido de compuesto y/o sustrato. Los isótopos tritados (^3H) y de carbono-14 (^{14}C) son útiles por su facilidad de preparación y su detectabilidad. Además, la sustitución con isótopos más pesados tales como deuterio (^2H) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas resultantes de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, aumento de la semivida *in vivo* o reducción de los requisitos de dosificación) y, por lo tanto, pueden preferirse en algunas circunstancias. Los isótopos emisores de positrones tales como ^{15}O , ^{13}N , ^{11}C y ^{18}F son útiles para estudios por tomografía de emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato.

El compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y GDC-0973 se formulan de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar para su uso en una combinación terapéutica para el tratamiento terapéutico (incluyendo el tratamiento profiláctico) de uno de los cánceres seleccionados en mamíferos, incluyendo seres humanos. La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y GDC-0973 en asociación con uno o más vehículos, emolientes, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

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

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

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

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

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

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

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

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidas (documento US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D (-) 3-hidroxibutírico.

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

Las formulaciones de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o el agente quimioterapéutico adecuado para administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como píldoras, cápsulas de gelatina, por ejemplo duras o blandas, obleas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, jarabes o elixires que contienen cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y/o un agente quimioterapéutico. La cantidad de compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y la cantidad de agente quimioterapéutico pueden formularse en una píldora, cápsula, solución o suspensión en forma de una formulación combinada. Como alternativa, el compuesto de Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el agente quimioterapéutico se pueden formular por separado en una píldora, cápsula, solución o suspensión para la administración por alternancia.

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

opcionalmente se formulan para que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo del mismo.

Los excipientes de comprimidos de una formulación farmacéutica de la invención pueden incluir: Una carga (o diluyente) para aumentar el volumen en masa del fármaco en polvo que constituye el comprimido; disgregantes para fomentar la rotura del comprimido en pequeños fragmentos, idealmente partículas de fármaco individuales, cuando se ingiere y se favorece la rápida disolución y absorción del fármaco; aglutinante para asegurar que pueden formarse los gránulos y comprimidos con la resistencia mecánica requerida y que se mantiene un comprimido junto después de haber sido prensado, evitando que se fragmente en sus polvos de componentes durante el envasado, envío y manipulación de rutina; emoliente para mejorar la fluidez del polvo que compone el comprimido durante la producción; lubricante para asegurar que el polvo de formación de comprimidos no se adhiere al equipo utilizado para presionar el comprimido durante la fabricación. Estos mejoran el flujo de las mezclas de polvo a través de las prensas y minimizan la fricción y la rotura a medida que los comprimidos terminados son expulsados del equipo; antiadherente con función similar a la del emoliente, que reduce la adhesión entre el polvo que constituye el comprimido y la máquina que se utiliza para perforar la forma del comprimido durante la fabricación; saporífero incorporado en los comprimidos para darles un sabor más agradable, o para enmascarar uno desagradable; y colorante para facilitar la identificación y el cumplimiento por el paciente.

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

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

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

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

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

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de un preparado inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril puede ser una solución o una suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, tal como una solución en 1,3-butanodiol, o puede prepararse a partir de un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se

encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, pueden emplearse convencionalmente aceites fijos estériles como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, se pueden usar ácidos grasos, tal como ácido oleico, en la preparación de inyectables.

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

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

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

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

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

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

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

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

55 Una realización proporciona composiciones veterinarias que comprenden un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y GDC-0973 junto con un vehículo veterinario para el mismo. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que por lo demás son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el principio activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, por vía oral o por
60 cualquier otra vía deseada.

TERAPIA DE COMBINACIÓN

65 El compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede emplearse junto con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno hiperproliferativo, incluyendo

tumores, cánceres y tejido neoplásico, junto con trastornos hiperproliferativos pre-neoplásicos y no neoplásicos o no neoplásicos. En ciertas realizaciones, un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se combina en un régimen de dosificación como terapia de combinación, con GDC-0973. En una realización, la combinación terapéutica se administra mediante un régimen de dosificación en el que la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra en un intervalo entre dos veces al día y a una vez cada tres semanas (q3wk), y la cantidad terapéuticamente eficaz de GDC-0973 se administra en un intervalo de dos veces al día a una vez cada tres semanas.

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

15 En una realización de la invención, el compuesto de fórmula I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 días después del comienzo de la administración del uno o más agentes. En otra realización específica, el compuesto de fórmula I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a 10 días antes del comienzo de la administración de la combinación. En otra realización específica, la administración del compuesto de fórmula I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y la administración de GDC-0973 comienza en el mismo día.

20 Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente son aquellas que se utilizan actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente recién identificado y otros agentes o tratamientos quimioterapéuticos, tal como aumentar el índice terapéutico o mitigar la toxicidad u otros efectos secundarios o consecuencias. Las cantidades del compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y GDC-0973 y la programación cronológica de la administración se seleccionarán con el fin de conseguir el efecto terapéutico combinado deseado.

30 ADMINISTRACIÓN DE COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Los compuestos pueden administrarse por cualquier vía apropiada para la afección a tratar. Las vías adecuadas incluyen la vía oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, inhalación, intradérmica, intratecal, epidural, y técnicas de infusión), transdérmica, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. La administración tópica puede implicar también el uso de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis.

40 La formulación de fármacos se analiza en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed., (1995) Mack Publishing Co., Easton, PA. Pueden encontrarse otros ejemplos de formulaciones de fármacos en Liberman, H. A. y Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol. 3, 2^a Ed., Nueva York, NY. Para el tratamiento inmunosupresor local, los compuestos se pueden administrar por administración intralesional, incluyendo la perfusión o poniendo en contacto de otra manera el injerto con el inhibidor antes del trasplante. Se apreciará que la vía preferida puede variar por ejemplo con la afección del receptor. Cuando el compuesto es administrado por vía oral, puede formularse como una píldora, cápsula, comprimido, etc., con un vehículo, emoliente, o excipiente farmacéuticamente aceptable. Cuando el compuesto se administra parenteralmente, se puede formular con un vehículo o diluyente parenteral farmacéuticamente aceptable, y en una forma inyectable de dosificación unitaria, como se detalla a continuación.

50 Una dosis para tratar pacientes humanos puede variar de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 1600 mg por día del compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una dosis típica puede ser de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 800 mg del compuesto. Una dosis puede administrarse una vez al día (QD), dos veces al día (BID) o más frecuentemente, dependiendo de las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD), incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto en particular. Además, los factores de toxicidad pueden influir en la dosis y en el régimen de dosificación de la administración. Cuando se administra por vía oral, la píldora, cápsula o comprimido pueden ingerirse dos veces al día, a diario o menos frecuentemente, tal como semanalmente o una vez cada dos o tres semanas durante un período de tiempo especificado. El régimen se puede repetir durante varios ciclos de terapia.

60 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

Las combinaciones terapéuticas de: (1) un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y (2) un agente quimioterapéutico son útiles para tratar enfermedades, afecciones y/o trastornos, incluyendo, pero sin limitación, los modulados por AKT cinasa en un mamífero. Los cánceres que pueden tratarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, mesotelioma, endometrial, glioma, de páncreas, de mama, de pulmón, de ovario, de próstata, melanoma, gástrico, de colon, de cabeza y cuello.

Se ha determinado que ciertas combinaciones proporcionan efectos mejorados frente a determinados fenotipos de cáncer. Por ejemplo, determinadas combinaciones proporcionan efectos mejorados frente a cánceres asociados con la mutación PTEN (o estado bajo o nulo), la mutación AKT (o altos niveles de expresión o de amplificación de pAKT), la mutación PI3K, la amplificación Her2/ErbB2, las mutaciones RAS, las mutaciones RAF o una combinación de las anteriores.

Por consiguiente, determinadas combinaciones descritas en el presente documento pueden ser particularmente útiles frente a estos tipos de cánceres.

10 Por ejemplo, en cáncer colorrectal, las mutaciones PI3k/AKT (por ejemplo, PI3K H1047R, E545K, D549N, P421L, L568F, P449T o combinaciones de las mismas) en combinación con las mutaciones RAS/RAF (KRAS, G13D, G12D, G12V o combinaciones de las mismas) son predictivas de fuertes respuestas a la combinaciones del presente documento y se ha visto una gran sinergia para la combinación de GDC-0068 más GDC-0973.

15 También, en cáncer de pulmón no microcítico, se ha observado una gran sinergia para la combinación de GDC-0068 más GDC-0973 en la que: (i) las combinaciones de PI3k/AKT (PI3k E545K, L997P, M772X, N996H o combinaciones de las mismas) y las mutaciones RAS/RAF (Q61H, G12C, Q61K, N85K, G12S, BRAF V600E o combinaciones de las mismas) tienen lugar, y (ii) tienen lugar combinaciones de RAS/RAF sin mutaciones PI3K.

20 También, en melanoma, se ha visto una fuerte sinergia para la combinación de GDC-0068 más GDC-0973 cuando: (i) tienen lugar mutaciones BRAF V600E (ii) tienen lugar mutaciones BRAF V600E o deleciones o amplificaciones con mutaciones PTEN, de estado nulo o bajo con altos niveles de expresión o de actividad de pAKT.

25 Los kits para ensayar si un paciente comprende la mutación BRAF V600E están comercialmente disponibles. Un ejemplo es el ensayo de mutación BRAF V600 COBAS® (Roche Molecular Systems Inc.), que detecta la mutación BRAF V600E en tejido de melanoma humano embebido en parafina y fijado con formalina (FFPET). Está aprobado en los Estados Unidos como un diagnóstico complementario para el tratamiento con vemurafenib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, diseñado para tratar pacientes cuyos tumores de melanoma albergan la forma mutada del gen BRAF. En investigaciones preclínicas y clínicas, el ensayo de mutación BRAF cobas® tuvo un 30 97,3 % de concordancia positiva en la detección de la mutación BRAF V600E (1799 T>A), que representa más de aproximadamente el 85 % de todas las mutaciones BRAF documentadas en la base de datos COSMIC. En tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPET), el ensayo de mutación BRAF cobas® puede detectar mutaciones V600E a un nivel de mutación de más del 5 %. El ensayo también puede detectar otras mutaciones de V600 tales como V600D y V600K. El ensayo de mutación BRAF de cobas® se puede realizar en menos de 8 horas desde la recepción de la muestra, tal como una muestra de tejido o de células tumorales obtenidas del paciente. El 35 ensayo de mutación 4800 BRAF V600 de cobas® es un ensayo de PCR en tiempo real sobre el Sistema 4800 cobas®, v2.0, y se pretende usarlo como una ayuda en la selección de pacientes con melanoma cuyos tumores llevan la mutación BRAF V600E.

40 El estado nulo (o bajo) de PTEN se puede medir mediante cualquier medio adecuado tal como se conoce en la materia. En un ejemplo, se usa IHC. Como alternativa, se puede usar el análisis por transferencia de Western. Los anticuerpos para PTEN están comercialmente disponibles (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA). Los procedimientos a modo de ejemplo para IHC y el análisis por transferencia de Western para el estado de PTEN se describe en Neshat, M. S. *et al.* Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*98, 10314-10319 (2001) y Perren, A., *et al.* Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, *American Journal of Pathology*, Vol. 155, N.º 4, Octubre 1999. Adicionalmente, los cánceres asociados con la mutación AKT, la mutación PI3K y con la amplificación Her2/ErbB2 se pueden identificar usando técnicas que se conocen en la materia.

50 El nivel de activación de fosforilación de AKT("pAKT") en comparación con el nivel de AKT no activado o no fosforilado en una muestra dada se puede medir mediante métodos conocidos en la materia. El estado de pAKT se puede expresar en términos de una proporción (por ejemplo, cantidad de pAKT en una célula tumoral dividida entre la cantidad de pAKT en una célula no tumoral del mismo tipo) o una resta (por ejemplo, la cantidad de pAKT en una célula tumoral menos la cantidad de pAKT en la célula o en una célula no tumoral del mismo tipo). El perfil de pAKT también se puede expresar en términos del nivel de activación de la vía midiendo las cantidades de dianas de AKT fosforiladas aguas abajo (por ejemplo, pGSK o PRAS40). Un elevado pAKT se refiere a los niveles de activación o de fosforilación de AKT global en la muestra que son más altos que un valor de partida. En un ejemplo, el valor de partida son los niveles basales de pAKT para un tipo celular dado. En otro ejemplo, el valor de partida es el nivel promedio o medio de pAKT en una población dada de células de la muestra, por ejemplo, células no cancerosas. En otro ejemplo, un elevado pAKT se refiere a una célula tumoral que sobreexpresa o sobre amplifica AKT fosforilado o activado en la célula, cuando se compara con un promedio de células normales, sanas (por ejemplo, no tumorosas) del mismo tipo para el mismo mamífero o grupo de pacientes. El perfil de pAKT también se puede usar en conjunto con otros marcadores, por ejemplo, perfiles de localización FOXO3a, para predecir la eficacia de determinados 65 inhibidores de la vía PI3K/ALT cinasa, o por ejemplo, con el estado de mutación BRAF V600E, para predecir la eficacia de determinadas combinaciones de compuestos de fórmula I con vemurafenib, particularmente en pacientes

con cánceres resistentes a vemerafenib, tales como melanoma metastásico o inoperable. Los kits para medir pAKT en muestras de tejido están comercialmente disponibles (por ejemplo, el kit fosfo-Akt (Thr308) STAR ELISA, EMD Millipore).

- 5 Los kits para analizar la presencia de mutaciones PI3K, KRAS y AKT están comercialmente disponibles (Qiagen).

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

- 10 En otra realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, útil para el tratamiento de las enfermedades y trastornos que se han descrito anteriormente. En una realización, el kit comprende un recipiente y un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

- 35 El kit puede comprender además instrucciones para la administración del compuesto de un compuesto de fórmula I o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente que necesita las mismas.

- 40 En otra realización, los kits son adecuados para la administración de formas orales sólidas de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como comprimidos o cápsulas. Tal kit incluye preferiblemente varias dosificaciones unitarias. Dichos kits pueden incluir una tarjeta que tiene las dosificaciones orientadas en el orden de su uso pretendido. Un ejemplo de tal kit es un "envase blíster". Los envases blíster se conocen bien en la industria del envasado y se usan ampliamente para el envasado de formas farmacéuticas de dosificación unitaria. Si se desea, se puede proporcionar una ayuda de recordatorio, por ejemplo en forma de números, letras u otras marcas o con un prospecto de calendario, designando los días en el programa de tratamiento en el que se pueden administrar las dosis.

- 50 De acuerdo con una realización, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo contenido en el mismo; y opcionalmente (b) un segundo recipiente con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en el que la segunda formulación farmacéutica comprende GDC-0973. Como alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y una solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

- 60 Cuando el kit comprende una composición del compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y GDC-0973, el kit puede comprender un recipiente para contener las composiciones separadas tal como una botella dividida o un paquete de aluminio dividido, sin embargo, las composiciones separadas pueden también estar contenidas dentro de un único recipiente no dividido. Normalmente, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma de kit es particularmente ventajosa cuando los componentes separados se administran preferiblemente en formas de dosificación diferentes (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en diferentes intervalos de dosificación, o cuando el médico responsable de la prescripción desea la titulación de los componentes individuales de la combinación.

65

REALIZACIONES ESPECÍFICAS

En una realización específica, el cáncer está asociado a la mutación de PTEN.

5 En una realización específica, el cáncer está asociado a la mutación, sobreexpresión o amplificación de AKT.

En una realización específica, el cáncer está asociado a la mutación de PI3K.

En una realización específica, el cáncer está asociado con una mutación KRAS.

10

En una realización específica, el cáncer está asociado con una mutación BRAF.

En una realización específica, el cáncer está asociado con una combinación de (1) una mutación PTEN, AKT o PI3K, y (2) una mutación KRAS o BRAF.

15

En una realización específica, el cáncer es resistente a una o ambas terapias de agente único GDC-0068 y GDC-0973, pero sensible a la combinación de GDC-0068 y GDC-0973.

20

En un aspecto específico de la invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el cáncer es de colon.

En un aspecto específico de la invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el cáncer es de pulmón.

25

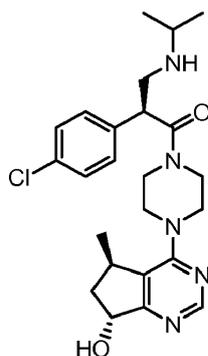
En un aspecto específico de la invención, el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en combinación con GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y el cáncer es melanoma.

30

Ejemplos

Con el fin de ilustrar la invención, se incluyen los siguientes ejemplos. Sin embargo, se entenderá que estos ejemplos no limitan la invención y únicamente pretenden sugerir un método para poner en práctica la invención.

35

Ejemplo 1

40 (S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilamino)propan-1-ona

Etapas 1: Se enfrió pulegenato de etilo (130 g, 662 mmol) en EtOAc (900 ml) a -78 °C usando un baño de hielo seco-isopropanol. Esta mezcla se sometió a ozonólisis hasta que la reacción se volvió de color púrpura. En este punto, se detuvo la generación de ozono, y la reacción se retiró del baño de hielo seco. Se burbujeó oxígeno a través de la mezcla de reacción hasta que se volvió de color amarillo. La mezcla de reacción se concentró al vacío, y el residuo resultante se disolvió en ácido acético glacial (400 ml). La solución se enfrió a 0 °C, y se añadió en porciones polvo de Zn (65 g, 993 mmol) durante 30 minutos. Después, la reacción se dejó en agitación durante 2 horas, momento en el que la mezcla de reacción se filtró a través de una capa de celite para retirar el polvo de cinc. El ácido acético se neutralizó a pH 7 con NaOH acuoso y NaHCO₃ y se extrajo con éter (3 x 800 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron con salmuera, MgSO₄ y se concentraron para dar 2-metil-5-oxociclopentano-carboxilato de (2R)-etilo en forma de un líquido de color pardo (107 g, 95 %).

50

Etapas 2: Se añadió acetato de amonio (240,03 g, 3113,9 mmol) a una solución de 2-metil-5-

oxociclopentanocarboxilato de (R)-etilo (106,0 g, 622,78 mmol) en MeOH (1,2 l). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 20 horas, después de lo cual se completó según se determinó por TLC y HPLC. La mezcla de reacción se concentró para retirar el MeOH. El residuo resultante se disolvió en DCM, se lavó dos veces con H₂O, una vez con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró para dar 2-amino-5-metilciclopent-1-enocarboxilato de (R)-etilo (102 g, rendimiento del 97 %) en forma de un aceite de color naranja. LC/MS (APCI+) m/z 170 [M+H]⁺.

Etapa 3: Una solución que contenía 2-amino-5-metilciclopent-1-enocarboxilato de (R)-etilo (161,61 g, 955,024 mmol) y formiato amónico (90,3298 g, 1432,54 mmol) en formamida (303,456 ml, 7640,19 mmol) se calentó a una temperatura interna de 150 °C y se agitó durante 17 horas. La mezcla de reacción se enfrió, y se transfirió a un matraz de una boca de 2 l. Después, el exceso de formamida se retiró por destilación a alto vacío. Una vez se detuvo la formación de formamida, el aceite restante en el destilador se disolvió en DCM y se lavó con salmuera (3 x 200 ml). Los lavados acuosos combinados se extrajeron con DCM. Los extractos orgánicos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El aceite de color pardo resultante se disolvió en DCM mínimo, y esta solución se añadió usando un embudo de decantación a una solución agitada de éter (aprox. 5 vol. de éter frente a una solución de DCM), causando la formación de algo de precipitado de color pardo. Este precipitado de color pardo se retiró por filtración a través de un embudo sinterizado medio que se aclaró con éter y se desechó. El filtrado se concentró, la trituración de éter se repitió dos veces más y después se secó en una línea de alto vacío para dar (R)-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-ol (93,225 g, rendimiento del 65,00 %) en forma de un sólido pastoso de color pardo-amarillo. LC/MS (APCI-) m/z 149,2.

Etapa 4: Se añadió lentamente POCl₃ puro (463,9 ml, 5067 mmol) mediante un embudo de adición a una solución a 0 °C de (R)-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-ol (152,2 g, 1013 mmol) en DCE (1,2 l). Después de la finalización de la adición, la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente, después se calentó a reflujo y se agitó durante 70 minutos. La reacción se completó según se determinó por HPLC. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y el exceso de POCl₃ se inactivó en 4 porciones como se indica a continuación: La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de decantación y se añadió por goteo en un vaso de precipitados que contenía hielo y una solución saturada de NaHCO₃ enfriada en un baño de hielo. Una vez que se completó la adición de cada porción de la mezcla de reacción, la mezcla inactivada se agitó durante 30 minutos para asegurar la destrucción completa de POCl₃ antes de la transferencia al embudo de decantación. La mezcla se transfirió al embudo de decantación y se extrajo dos veces con DCM. Los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice como se indica a continuación: Se suspendió gel de sílice (1 kg) en 9:1 de hexano:acetato de etilo sobre un embudo sinterizado de 3 l, la sílice se sedimentó al vacío, y se coronó con arena. El producto en bruto se cargó con una mezcla de DCM/hexano, y el compuesto se eluyó usando matraces de brazo lateral de 1 l al vacío. Los subproductos de alto Fr eluyeron en primer lugar, después (R)-4-cloro-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (104,4 g, rendimiento del 61,09 %) en forma de un aceite de color pardo. Se añadieron trietilamina (93,0 ml, 534 mmol) y piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (34,8 g, 187 mmol) a una solución de (R)-4-cloro-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (30,0 g, 178 mmol) en n-BuOH (250 ml). La mezcla de reacción se calentó a reflujo en una atmósfera de nitrógeno y se agitó durante una noche (17 horas), después de lo cual se concentró en un evaporador rotatorio. El aceite resultante se disolvió en DCM, se lavó con H₂O, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró. El aceite de color pardo resultante se purificó sobre gel de sílice eluyendo en primer lugar con 2:1 de hexanos:acetato de etilo hasta que el producto se eluyó limpiamente, después de un gradiente de 1:1 a 1:5 de DCM:acetato de etilo para dar 4-(5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (R)-terc-butilo (42,0 g, rendimiento del 74,1 %) en forma de un polvo beige. LC/MS (APCI+) m/z 319,1 [M+H]⁺.

Etapa 5: Se añadió en porciones MCPBA sólido máx. al 77 % (23,9 g, 107 mmol) a una solución a 0 °C de 4-(5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (R)-terc-butilo (20,0 g, 62,8 mmol) en CHCl₃ (310 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos, después se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 90 minutos. El análisis por HPLC parecía similar después de 7,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, después se añadieron NaHCO₃ (13,2 g, 157 mmol) y 0,5 equivalentes más de m-CPBA. La mezcla de reacción se agitó durante una noche (14 horas). La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y se añadió gota a gota mediante un embudo de adición una solución de Na₂S₂O₃ (29,8 g, 188 mmol) en H₂O (50 ml). Esto se siguió de una solución de Na₂CO₃ (24,6 g, 232 mmol) en H₂O (70 ml) mediante un embudo de adición (la mezcla se volvió homogénea). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, después la mezcla se extrajo con CHCl₃ (3 x 150 ml). Los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron para dar el N-óxido. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]⁺.

Etapa 6: Se añadió Ac₂O (77,0 ml, 816 mmol) al N-óxido (21,0 g, 62,8 mmol) de la Etapa 5. La mezcla de reacción se calentó en una atmósfera de nitrógeno en un baño de arena a 90 °C y se agitó durante 100 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, y el exceso de anhídrido acético se retiró por evaporación rotatoria. El aceite resultante se disolvió en DCM, que después se vertió cuidadosamente en Na₂CO₃ saturado en hielo. La mezcla se extrajo con DCM, y los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron para dar 4-(7-acetoxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (5R)-terc-butilo (23,6 g, 100 %) en forma de una espuma de color pardo. LC/MS (APCI+) m/z 377,1 [M+H]⁺.

- Etapa 7:** Se añadió LiOH-H₂O (6,577 g, 156,7 mmol) a una solución a 0 °C de 4-(7-acetoxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (5R)-terc-butilo (23,6 g, 62,69 mmol) en 2:1 de THF:H₂O (320 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos, y después se calentó a temperatura ambiente. LC/MS parecía igual a las 3 horas y las 4,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, y después a la mezcla se le añadió NH₄Cl saturado. La mezcla se agitó durante 5 minutos, y la mayor parte del THF se retiró por evaporación rotatoria. La mezcla se extrajo con EtOAc (3 x 250 ml), y los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida en Biotage 65M: 4:1 de DCM:acetato de etilo, después a gradiente de 1:1 a 1:4 de DCM:acetato de etilo. Una vez que el producto se eluyó, entonces el acetato de etilo se lavó abundantemente a través de la columna. Después, 30:1 de DCM:MeOH eluyó el resto del producto (8,83 g). Las fracciones mixtas se sometieron de nuevo a cromatografía ultrarrápida con Biotage 40M usando las mismas condiciones para dar 2,99 g más que dieron un rendimiento combinado de 4-(7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (5R)-terc-butilo (11,82 g, rendimiento del 56,38 %) en forma de una espuma de color pardo. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]⁺.
- Etapa 8:** Una solución de DMSO (5,45 ml, 76,8 mmol) en DCM (50 ml) se añadió gota a gota mediante un embudo de adición a una solución a -78 °C de cloruro de oxalilo (3,35 ml, 38,4 mmol) en DCM (150 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 35 minutos, y después se añadió lentamente una solución de 4-(7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (5R)-terc-butilo (9,17 g, 27,4 mmol) en DCM (80 ml) mediante un embudo de adición. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora más a -78 °C, después de lo cual, a la mezcla se le añadió trietilamina pura (18,0 ml, 129 mmol). Después, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente, y después se agitó durante 30 minutos. Se añadió H₂O. La mezcla se extrajo con DCM (3 x 200 ml), y los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El producto en bruto se purificó sobre gel de sílice (Biotage 65M): la columna se lavó abundantemente con aprox. 800 ml de 4:1 de DCM:EtOAc, después a un gradiente de 1:1 de DCM:acetato de etilo hasta la elución del producto, después a 1:4 de DCM:EtOAc se eluyó el producto para dar 4-(5-metil-7-oxo-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (R)-terc-butilo (7,5 g, rendimiento del 82,3 %) en forma de una espuma de color pardo. La espuma se concentró (3 x) en DCM/hexanos, que dio una espuma de color pardo muy claro. HPLC >95 % de área. LC/MS (APCI+) m/z 333 [M+H]⁺.
- Etapa 9:** Se añadieron trietilamina (4,33 ml, 31,1 mmol; desgasificada con nitrógeno 30 minutos antes de su uso) y ácido fórmico (1,36 ml, 36,1 mmol; desgasificado con nitrógeno 30 minutos antes de su uso) a una solución de 4-(5-metil-7-oxo-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de (R)-terc-butilo (9,75 g, 29,3 mmol) en DCM (210 ml; desgasificado con nitrógeno 30 minutos antes de su uso). La mezcla se agitó durante 5 minutos, después se añadió un catalizador de Ru (0,0933 g, 0,147 mmol). La reacción se agitó a una presión de nitrógeno positiva durante una noche (18 horas). La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se secó al vacío. El material impuro se sometió a cromatografía ultrarrápida en Biotage 65M cargada de 1:1 de DCM:acetato de etilo, se lavaron abundantemente 500 ml, después a 1:4 de DCM:acetato de etilo hasta el producto (2º punto), después a gradiente de acetato de etilo puro, después a 25:1 de DCM:MeOH se eluyó el resto del producto. Las fracciones se combinaron y se concentraron en un evaporador rotatorio. El residuo se concentró de nuevo en DCM/hexanos para dar una mezcla de 4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (principal) y 4-((5R,7S)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (secundario) (9,35 g, rendimiento del 95,3 %) en forma de una espuma de color beige. LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]⁺. 1H RMN (CDCl₃) muestra el 88 % por integración de carbinol metino.
- Etapa 10:** Se añadió cloruro de 4-nitrobenzoílo (4,27 g, 23,0 mmol) a una solución a 0 °C de 4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (7,0 g, 20,9 mmol) y trietilamina (4,38 ml, 31,4 mmol) en DCM (110 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche, después de lo cual se añadió NaHCO₃ saturado. La mezcla se agitó durante 10 minutos, y después se extrajo con DCM. Los extractos combinados se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron. El producto en bruto se sometió a cromatografía ultrarrápida en Biotage 65M (producto en bruto cargado con 3:1 de hexanos:acetato de etilo, después 2:1 de hexanos:acetato de etilo eluyeron 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloxi)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo y algunas fracciones mixtas). Después, se eluyó 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloxi)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo usando 1:2 de hexanos:acetato de etilo. Las fracciones con producto se concentraron por evaporación rotatoria para dar 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloxi)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (8,55 g, rendimiento del 84,5 %) en forma de una espuma de color amarillo. LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]⁺. 1H RMN (CDCl₃) muestra un diastereómero individual). Las fracciones con otro diastereómero se concentraron por evaporación rotatoria para dar 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloxi)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (0,356 g, rendimiento del 3,52 %) en forma de una espuma de color pardo. LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]⁺.
- Etapa 11:** Se añadió LiOH-H₂O (0,499 g, 11,9 mmol) a una solución a 0 °C de 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoiloxi)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (2,30 g, 4,76 mmol) en 2:1 de THF:H₂O (40 ml). La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La THF se retiró por evaporación rotatoria, se añadió NaHCO₃ saturado, y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. Los extractos combinados se lavaron (1 x) con NaHCO₃ saturado, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron

para dar 4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (1,59 g, rendimiento del 100,0 %) en forma de una espuma de color amarillo. Análisis por HPLC después del tratamiento solo producto >98 % de área puro. LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]⁺. El 4-((5R,7S)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo se preparó usando un método análogo.

5 Etapa 12: Se añadió HCl 4 M/dioxano (11,2 ml, 44,9 mmol) a una solución de 4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carboxilato de terc-butilo (0,600 g, 1,79 mmol) en dioxano (15 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante una noche (20 horas). La mezcla se concentró a sequedad y se secó en una línea de alto vacío. El producto en bruto se suspendió en éter, se sonicó y se agitó durante 5 minutos. Los sólidos se aislaron por filtración a través de un embudo sinterizado medio con presión de nitrógeno, se aclararon con éter, se secaron a presión de nitrógeno, y se secaron adicionalmente en una línea de alto vacío para dar diclorhidrato de (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-ol (0,440 g, rendimiento del 79,8 %) en forma de un polvo de color amarillo. LC/MS (APCI+) m/z 235. El diclorhidrato de (5R,7S)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-ol se preparó usando un método análogo.

10 Etapa 13: Se disolvieron/suspendieron 2-(4-clorofenil)acetato de metilo (36,7 g, 199 mmol) y paraformaldehído (6,27 g, 209 mmol) en DMSO (400 ml) y se trataron con NaOMe (537 mg, 9,94 mmol). La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 2 horas hasta la finalización por análisis de TLC del producto en bruto. La reacción se vertió en agua enfriada con hielo (700 ml; emulsión de color blanco) y se neutralizó con la adición de una solución 1 M de HCl. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x), y los productos orgánicos se combinaron. La capa orgánica se lavó con agua (2 x) y salmuera (1 x), se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar el producto en bruto en forma de un aceite de color amarillo. El residuo se cargó sobre un filtro sinterizado grande con gel de sílice y se eluyó con 9:1 de hexanos:acetato de etilo hasta que se recogieron el material de partida/olefina. Después, el lecho se eluyó con 1:1 de hexanos:acetato de etilo hasta que el producto puro deseado se eluyó completamente. Las fracciones puras concentradas produjeron 2-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropanoato de metilo en forma de un aceite incoloro (39,4 g, 92 %).

20 Etapa 14: Se disolvió 2-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropanoato de metilo (39,4 g, 184 mmol) en DCM (500 ml) y se trató con TEA (64,0 ml, 459 mmol). La solución se enfrió a 0 °C y se trató lentamente con MsCl (15,6 ml, 202 mmol), después se dejó en agitación durante 30 minutos hasta la finalización por el análisis de TLC. La solución se repartió con una solución 1 N de HCl, y la capa acuosa se extrajo una vez con DCM. La capa orgánica combinada se lavó una vez más con una solución 1 N de HCl, se separó, se lavó con una solución diluida de NaHCO₃ y se separó. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para proporcionar un aceite de color naranja. El residuo se cargó sobre un filtro sinterizado grande con un lecho de gel de sílice y se eluyó con 9:1 de hexanos:acetato de etilo proporcionando el producto puro deseado por análisis de TLC. Las fracciones puras concentradas produjeron el 2-(4-clorofenil)acrilato de metilo en forma de un aceite incoloro (30,8 g, 85 %). Éste 2-(4-clorofenil)acrilato de metilo (500 mg, 2,54 mmol) se añadió como una solución en THF (1,35 ml) a una solución en agitación de i-PrNH₂ (217 ul, 2,54 mmol) en THF (5,0 ml) a 0 °C. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una noche hasta la finalización por el análisis de LCMS. A la amina en agitación se le añadió Boc₂O (584 ul, 2,54 mmol) a través de una pipeta. La reacción se dejó en agitación durante una noche hasta la finalización por análisis de LCMS y TLC de la mezcla. La solución se concentró al vacío para proporcionar 3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoato de metilo en forma de un aceite incoloro (854 mg, 94 %). LC/MS (APCI+) m/z 256,1 [M-Boc]⁺.

30 Etapa 15: Se disolvió 3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoato de metilo (133 g, 374 mmol) en THF (1,0 l) y se trató con KOTMS (56,0 g, 392 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se dejó en agitación durante una noche hasta la finalización por análisis de LCMS del producto en bruto. La mezcla se concentró al vacío para proporcionar una espuma húmeda, que se dejó secar al vacío durante una noche para proporcionar 3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoato potásico en forma de un sólido de color blanco (148,7 g, 105 %). LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc-K]⁺.

45 Etapa 16: Se disolvió 3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoato potásico (77,2 g, 203 mmol) en THF (515 ml) y se trató con cloruro de pivaloilo (26,3 ml, 213 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se dejó en agitación durante 3 horas para formar el anhídrido mixto. Se disolvió (S)-4-benciloxazolidin-2-ona (46,1 g, 260 mmol) en THF (600 ml) y se enfrió a -78 °C en un matraz separado. La solución se trató con n-BuLi (102 ml de una solución 2,50 M en hexanos, 254 mmol) y se dejó agitar durante una hora. La solución de anhídrido preparada se añadió a la Li-oxazolidinona en agitación mediante una cánula, y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se inactivó con la adición de una solución saturada de cloruro de amonio, y después se repartió entre más agua y acetato de etilo. La capa acuosa se extrajo varias veces, y los productos orgánicos se combinaron. La capa orgánica se lavó con agua, después con salmuera, se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó/separó (diastereómeros) por cromatografía (gel de sílice eluida con 4:1 de hexanos:acetato de etilo) para proporcionar los diastereómeros completamente separados en forma de aceites viscosos: (R)-3-((S)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-oxopropil(isopropil)carbamato de terc-butilo (12,16 g, 24 % basado en 1/2 de racemato de ácido) y (S)-3-((S)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-oxopropil(isopropil)carbamato de terc-butilo (39,14 g, 77 % basado en 1/2 de racemato de ácido). LC/MS (APCI+)

m/z 401,2 [M-Boc]+.

5 Etapa 17: Se añadió LiOH-H₂O (168 mg, 4,00 mmol) a una solución en agitación de THF (30 ml) y agua (15 ml) a temperatura ambiente hasta que se disolvió. La mezcla se trató con peróxido de hidrógeno (658 ul de una solución al 35 % en peso en agua, 8,00 mmol) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. La reacción se enfrió a 0 °C en un baño de hielo, y el (S)-3-((S)-4-bencil-2-oxooxazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-oxopropil(isopropil)carbamato de terc-butilo (1,00 g, 2,00 mmol) se añadió gota a gota mediante un embudo de adición en forma de una solución en THF (15 ml) durante 10 minutos. La mezcla se dejó en agitación durante una noche a temperatura ambiente hasta la finalización por análisis de LCMS del producto en bruto. La reacción se enfrió a 0 °C, y después se trató con una solución 1 M de Na₂SO₃ (9,00 ml) mediante un embudo de adición durante un periodo de diez minutos. Después de la finalización de la adición, la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla se concentró para retirar el THF, y después se diluyó con agua. La capa acuosa se lavó dos veces con acetato de etilo (descartada). La capa acuosa se repartió con acetato de etilo, después se trató gota a gota mientras se agitaba con HCl 1 M hasta que se consiguió un pH de 2-3. La capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo, y los productos orgánicos se combinaron. El producto orgánico se lavó con salmuera, se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El producto de aceite incoloro se secó a alto vacío durante una hora para proporcionar ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoico en forma de un aceite viscoso/espuma (685 mg, 100 %). LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc]+.

20 Etapa 18: Una solución de diclorhidrato de (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-ol (2,92 g, 9,51 mmol) y ácido (S)-3-(terc-butoxicarbonil(isopropil)amino)-2-(4-clorofenil)propanoico (3,25 g, 9,51 mmol) en DCM (40 ml) y DIEA (5,0 ml, 28,7 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A la mezcla se le añadió HBTU (3,61 g, 9,51 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El disolvente se retiró, y el residuo se disolvió en acetato de etilo (500 ml) y se lavó con agua (6 x 100 ml). La fase orgánica se secó y se concentró. El residuo se sometió a cromatografía en columna, y se eluyó por EtOAc-DCM/MeOH (20:1) para dar (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-oxopropil(isopropil)carbamato de terc-butilo (3,68 g, 69 %). LC/MS (APCI+) m/z 558,2 [M+H]+.

30 Etapa 19: El (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-oxopropil(isopropil) carbamato de terc-butilo (2,50 g, 4,48 mmol) se disolvió en dioxano (22,4 ml) y se trató con HCl 4 M en dioxano (22,4 ml, 89,6 mmol) a temperatura ambiente. La solución resultante se dejó en agitación durante una noche hasta su finalización por análisis LCMS del producto en bruto. La solución se concentró al vacío para proporcionar un gel que se disolvió en una cantidad mínima de metanol (10 ml). La solución se transfirió a través de una pipeta a éter agitado (300 ml) para proporcionar un precipitado de color blanco del producto deseado. La adición fue aproximadamente la mitad cuando el precipitado blanco se fundió en un gel de color amarillo. El material se concentró al vacío para proporcionar un gel de color amarillo que se dejó en reposo a presión reducida durante una noche para producir diclorhidrato de (S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-hidroxi-5-metil-6,7-dihidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilamino)propan-1-ona en forma de un polvo amarillo claro (2,14 g, 90 %).

40 ¹H RMN (D₂O, 400 MHz δ 8,39 (s, 1H), 7,37-7,35 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,23-7,20 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 5,29-5,25 (m, 1H), 4,33-4,29 (m, 1H), 4,14-4,10 (m, 1H), 3,89-3,19 (m, 11H), 2,23-2,17 (m, 1H), 2,08-1,99 (m, 1H), 1,20-1,18 (m, 6H), 0,98-0,96 (d, J = 6,8 Hz, 3H). MS (APCI+) [M+H]⁺ 458.

45 Ejemplo 2 Ensayos de proliferación de células *in vitro*

La potencia *in vitro* de la combinaciones del compuesto de fórmula I con ciertos agentes quimioterapéuticos específicos se puede medir usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo[®], disponible en el mercado en Promega Corp., Madison, WI. Este método de ensayo homogéneo se basa en la expresión recombinante de *Coleoptera* luciferasa (documentos US 5583024; US 5674713; US 5700670) y determina el número de células viables en el cultivo basado en la cuantificación de la ATP presente, un indicador de células metabólicamente activas (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160: 81-88; documento US 6602677). El ensayo CellTiter-Glo[®] se puede realizar en un formato de 96 o 384 pocillos, que lo hace válido para el cribado automatizado de alto rendimiento (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6: 398-404). El procedimiento de ensayo homogéneo implica la adición del reactivo individual (reactivo CellTiter-Glo[®]) directamente a las células cultivadas en medio complementado con suero. El lavado de células, la eliminación del medio y las múltiples etapas de pipeteado no son necesarias. El sistema detecta una cantidad tan pequeña como 15 células/pocillo en un formato de 384 pocillos en 10 minutos después de añadir el reactivo y mezclar.

El formato homogéneo "añadir-mezclar-medir" da como resultado la lisis celular y la generación de una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cantidad de ATP es directamente proporcional al número de células presentes en el cultivo. El ensayo CellTiter-Glo[®] genera una señal luminiscente de "tipo resplandor", producida por la reacción con la luciferasa, que tiene una semivida generalmente mayor de cinco horas, dependiendo del tipo de células y del medio utilizado. Las células viables se reflejan en unidades relativas de luminiscencia (RLU). El sustrato, luciferina de escarabajo, se descarboxila oxidativamente por luciferasa de luciérnaga recombinante con la conversión concomitante de ATP en AMP y la generación de fotones. La prolongada semivida elimina la necesidad de usar inyectores de reactivo y proporciona flexibilidad para el procesamiento de

modo continuo o en lotes de múltiples placas. Este ensayo de proliferación de células se puede utilizar con varios formatos de múltiples pocillos, por ejemplo, formato de 96 o 384 pocillos. Los datos pueden registrarse por un dispositivo de luminómetro o imágenes por cámara CCD. El resultado de la luminiscencia se presenta como unidades luminosas relativas (RLU), medidas a lo largo del tiempo.

5

Ejemplo 3 Eficacia del xenoinjerto tumoral *in vivo*

La eficacia de las combinaciones representativas de la invención se midieron *in vivo* implantando aloinjertos o xenoinjertos de células cancerosas en roedores y tratando con las combinaciones a los animales portadores de tumor. Son de esperar resultados variables dependiendo de la línea celular, la presencia o ausencia de ciertas mutaciones en las células tumorales, la secuencia de administración del régimen de dosificación de los compuestos, y otros factores. Los ratones objeto se trataron con fármaco(s) o control (vehículo) y se supervisaron durante varias semanas o más para medir el tiempo hasta la duplicación del tumor, la destrucción celular logarítmica y la inhibición tumoral.

10

15

Los resultados para las combinaciones representativas de la invención que se ensayaron en este modelo se presentan en las figuras.

20

Los datos en las figuras demuestran que las combinaciones representativas proporcionan mejores resultados en comparación con la administración de los agentes respectivos individualmente.

Ejemplo 4 Medición del estado PTEN

El estado PTEN puede medirse mediante cualquier medio adecuado que se conozca en la técnica. En un ejemplo, se usa IHC. Como alternativa, puede usarse análisis por Western blot. Los anticuerpos contra PTEN están disponibles en el mercado (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA). Los procedimientos a modo de ejemplo para IHC y el análisis por Western blot para el estado PTEN se describen en Neshat, M. S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, Proc. Natl Acad. Sci. USA 98, 10314-10319 (2001) y Perren, A., et. al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expression in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol. 155, n.º 4, octubre de 1999. Además, los cánceres asociados a la mutación de AKT, la mutación de PI3K, y a la amplificación o mutación de Her2/ErbB2 pueden identificarse usando técnicas que se conocen en la técnica.

25

30

Ejemplo 5 Ensayos de viabilidad celular

Las células se colocaron en placas negras, de fondo claro, de 384 pocillos (catálogo 353962: Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ) a una densidad de 1500 células/pocillo y se incubaron toda la noche hasta 1,5 días a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las diluciones seriadas de GDC-0068, de GDC-0973 o de ambas en combinación se añadieron después a las células y se incubaron durante otras 96 horas. La viabilidad celular se determinó midiendo los niveles celulares de adenosin trifosfato (ATP) tal como se describe en el protocolo del fabricante (kit de ensayo luminiscente de viabilidad celular CellTiter-Glo; catálogo G7573; Promega, Madison, WI). La señal luminiscente se registró sobre un lector Vision 2101 Multilabel (PerkinElmer; Waltham, MA).

35

40

El porcentaje de inhibición se calculó dividiendo la unidad de luz relativa (ULR) de las células expuestas a la combinación de GDC-0068 y GDC-0973 entre la ULR de células expuestas a DMSO y restándolo de 1, tal como se expresa a continuación:

45

$$\% \text{ inhibición} = 1 - (\text{ULR}_{\text{combinación}} / \text{ULR}_{\text{DMSO}})$$

El análisis BLISS comparó el % de inhibición esperado ($E = E_{\text{GDC-0068}} + E_{\text{GDC-0973}} - E_{\text{GDC-0068}} \times E_{\text{GDC-0973}}$) con el % de inhibición observado de forma experimental, E_{OBS} . La puntuación BLISS es la diferencia ($\Delta E = E_{\text{OBS}} - E$) entre el % de inhibición esperado, E , y la inhibición observada de forma experimental, E_{OBS} .

50

Las puntuaciones de BLISS cuantifican el grado de potenciación de agentes únicos, y una puntuación de BLISS positiva sugiere una aditividad mayor que la simple. Una puntuación total de BLISS mayor de 250 considera que la sinergia observada es fuerte en los intervalos de concentración ensayados.

55

Los ejemplos de las potencias de combinación se muestran como mapas de calor en tres líneas de células cancerosas: A2058, una línea celular de melanoma con deficiencia en PTEN y mutación B-RAF^{V600E} (véase la Figura 9); HCT-116, una línea celular de cáncer colorrectal (CRC) con las mutaciones PIK3CA^{H1047R} y KRAS^{G13D} (véase la Figura 5); y NCI-H2122, una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) con una mutación KRAS^{G12C} (véase la figura 7). Se observaron fuertes efectos sinérgicos con puntuaciones BLISS ≥ 15 para pares de dosis individuales a concentraciones de GDC-0068 entre 0,37 y 10 μM y concentraciones de GDC-0973 entre 0,062 y 0,56 μM en las tres líneas celulares.

60

Para investigar adicionalmente si el efecto sinérgico entre GDC-0068 y GDC-0973 depende de la activación de las vías RAS/RAF y/o PI3K/Akt, se compararon los efectos de combinación en un conjunto de líneas celulares que

65

derivan de un paciente con melanoma: la línea celular de melanoma metastásico MALME3M B-RAF^{V600E} y los fibroblastos de la piel normal del mismo paciente MALME3. Las células MALME3M presentaron sensibilidad a GDC-0973 a bajas concentraciones y un fuerte efecto sinérgico también se observó a bajas concentraciones de GDC-0973 y un amplio intervalo de concentraciones de GDC-0068 a pesar de la ausencia de la actividad del agente único de GDC-0068 (véase la figura 28). Por el contrario, las células MALME3 fueron resistentes a GDC-0973 y no se observó sinergia en combinación con GDC-0068 (véase la figura 29). Del mismo modo, NCI-BL2122, los linfoblastos B normales que derivan del mismo paciente que la línea celular de NSCLC, NCI-H2122, tampoco presentaron respuesta sinérgica a la combinación de GDC-0973 y GDC-0068 (véase la figura 30), al contrario que la fuerte sinergia en las células NCI-H2122 (véase la figura 7). Estos resultados sugieren que se puede observar de forma selectiva un beneficio terapéutico con combinaciones inhibidores de MEK y Akt en células cancerosas en las que o bien la vía RAS/RAF o ambas vías, PI3K/Akt y RAS/RAF están activas.

Ejemplo 6. Análisis por transferencia de Western

Los discos (10 cm²) se cultivaron con dos millones de células en un volumen de 10 ml seguido por la incubación a 37 °C con el 5 % de CO₂ toda la noche (aproximadamente 16 horas). Las células se expusieron a 1 y 3 μM de GDC-0068, 0,25 y 0,75 μM de GDC-0973 o 1 μM de GDC-0068 más 0,25 μM de GDC-0973 durante 3 horas. Tras la exposición, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y se lisaron en tampón de extracción celular 1x de Biosource (Carlsbad, CA) complementado con inhibidores de proteasa (Roche, Alemania), fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 1 mM y mezclas 1 y 2 de inhibidor de fosfatasa de Sigma (St. Louis, MO). La concentración de proteínas se determinó usando el método Bradford (ensayo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad; Hercules, CA)). Para las inmunotransferencias, las cantidades similares de proteína se separaron mediante electroforesis a través de geles de gradiente con Tris-Glicina al 4-20 % (Invitrogen; Carlsbad, CA); las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa usando el sistema Criterion y el protocolo de Bio-Rad.

Se usaron los siguientes anticuerpos, todos de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA), salvo que se especifique lo contrario:

anti-pAkt (S473)
 anti-pAkt (T308)
 anti pMEK1/2 (S217/221)
 anti-pFoxO1 (T24)/FoxO3a (T32)
 anti-pPRAS40 (T246)
 anti-p4EBP1 (T37/46)
 anti-pERK1/2 (T202/Y204)
 anti-pTSC2 (T1462)
 anti-pS6 (S235/236)
 anti-pS6 (S240/244)
 poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) y PARP escindida
 GAPDH (de Advanced ImmunoChemical; Long Beach, CA)

Para investigar el efecto de la combinación sobre la señalización de Akt y MEK, se evaluaron las dianas de aguas abajo tanto de Akt como de MEK mediante análisis por transferencia de Western en células de CRC HCT-116 expuestas a GDC-0068 a 1 y 3 μM, GDC-0973 a 0,25 y 0,75 μM, o GDC-0068 a 1 μM en combinación con GDC-0973 a 0,25 μM, en donde se observó el efecto sinérgico. Tal como se muestra en la figura 24, la atenuación génica combinada de las dianas de aguas abajo tanto de Akt como de MEK se observó en la combinación, con una atenuación génica mejorada de ambas dianas, tal como pTSC2, pS6 (tanto s235/236 como S240/244), PARP y PARP escindido, mostrando una mejor atenuación génica que cada agente único por separado incluso a dosis más altas.

Ejemplo 7. Ensayos de citometría de flujo

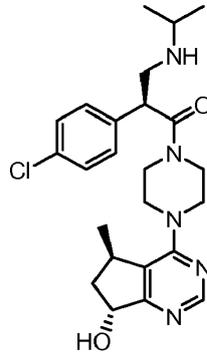
Las células HCT-116 se cultivaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Tras una incubación toda la noche a 37 °C, con CO₂ al 5 %, las células se expusieron bien a GDC-0068 o GDC-0973 o en combinación a concentraciones en aumento durante 4 días. Para detectar la apoptosis, se añadieron 100 μl de suspensión de células a 100 μl de PBS que contiene CaCl₂ 4 mM, 5 μl de isocianato de anexina fluoresceína V (FITC) (BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ), y 5 μg/ml de yoduro de propidio (PI). La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y las células se analizaron con un citómetro de flujo (BD Biosciences; San Jose, CA).

Se midió el porcentaje de células positivas en yoduro de propidio (PI) o en anexina V a cada agente único o par de combinación de GDC-0068 y GDC-0973, y se analizó el efecto sinérgico de la inducción de muerte celular mediante análisis de BLISS. La combinación dio como resultado un elevado porcentaje de células PI*/AV* en comparación con cada agente único por separado, con un fuerte efecto sinérgico observado (puntuación BLISS mayor o igual a 15) observado a 0,37 a 10 μM de GDC-0068 y 0,185 a 0,556 μM de GDC-0973. Por lo tanto, la combinación entre GDC-0068 y GDC-0973 también da como resultado un efecto sinérgico sobre la inducción de la muerte celular en células HCT-116.

Además, dado que numerosas modificaciones y cambios serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia, no se desea limitar la invención a la construcción exacta y al proceso mostrado tal como se describe anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación de un compuesto de fórmula I:



(Ia)

5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de un trastorno hiperproliferativo seleccionado de cáncer de colon, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de próstata.

10

2. La combinación de la reivindicación 1 para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el trastorno hiperproliferativo se selecciona de cáncer de colon, melanoma metastásico y cáncer de pulmón no microcítico.

3. La combinación de las reivindicaciones 1 o 2 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde:

15

- a) el compuesto de fórmula I o la sal del mismo se administran de manera simultánea con el GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o
- b) el compuesto de fórmula I o la sal y el GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran de manera secuencial; o
- c) la administración del GDC-0973 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comienza aproximadamente de 1 a aproximadamente 10 días antes de la administración de la combinación; o
- d) la administración del compuesto de fórmula I o la sal del mismo comienza aproximadamente de 1 a aproximadamente 10 días antes de la administración de la combinación; o
- e) la administración del compuesto de fórmula I o la sal del mismo y la administración del GDC-0973 o una sal farmacéuticamente del mismo comienzan el mismo día.

20

25

FIG 1 GDC-0068 y GDC-0973 (2,5 mg/kg): volúmenes tumorales

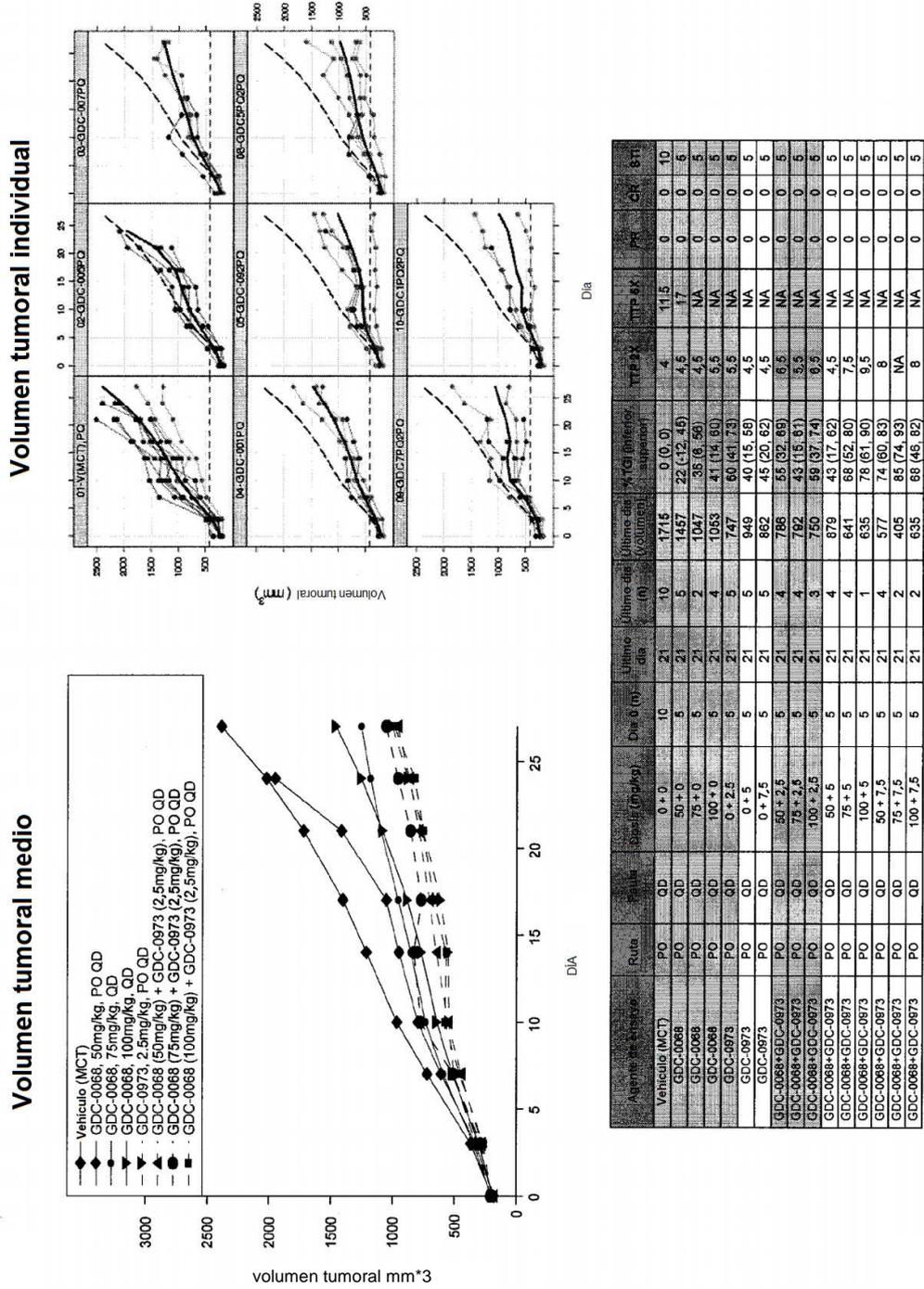


FIG 2 GDC-0068 y GDC-0973 (5 mg/kg): volúmenes tumorales

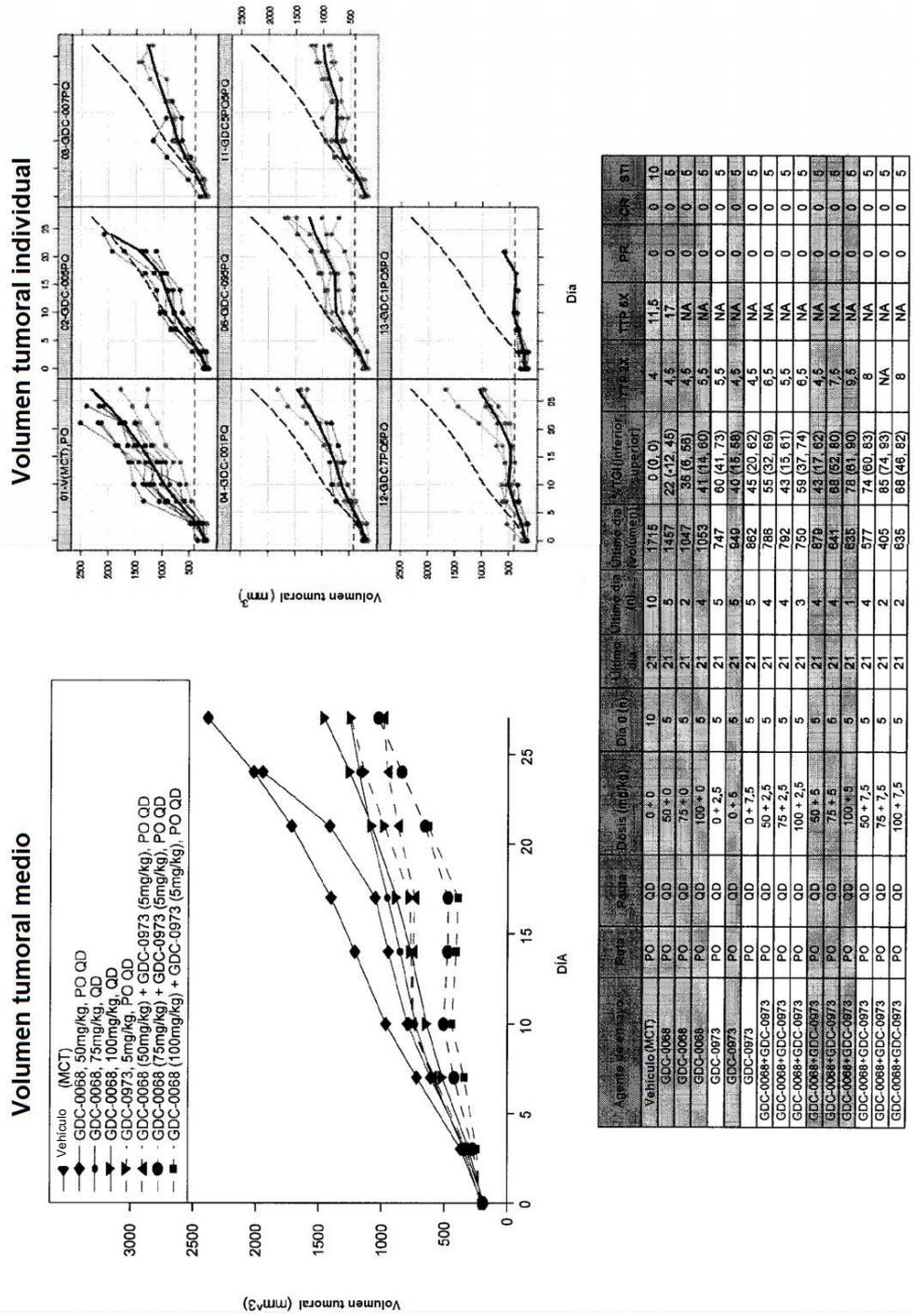


FIG 3 GDC-0068 y GDC-0973 (7,5 mg/kg): volúmenes tumorales

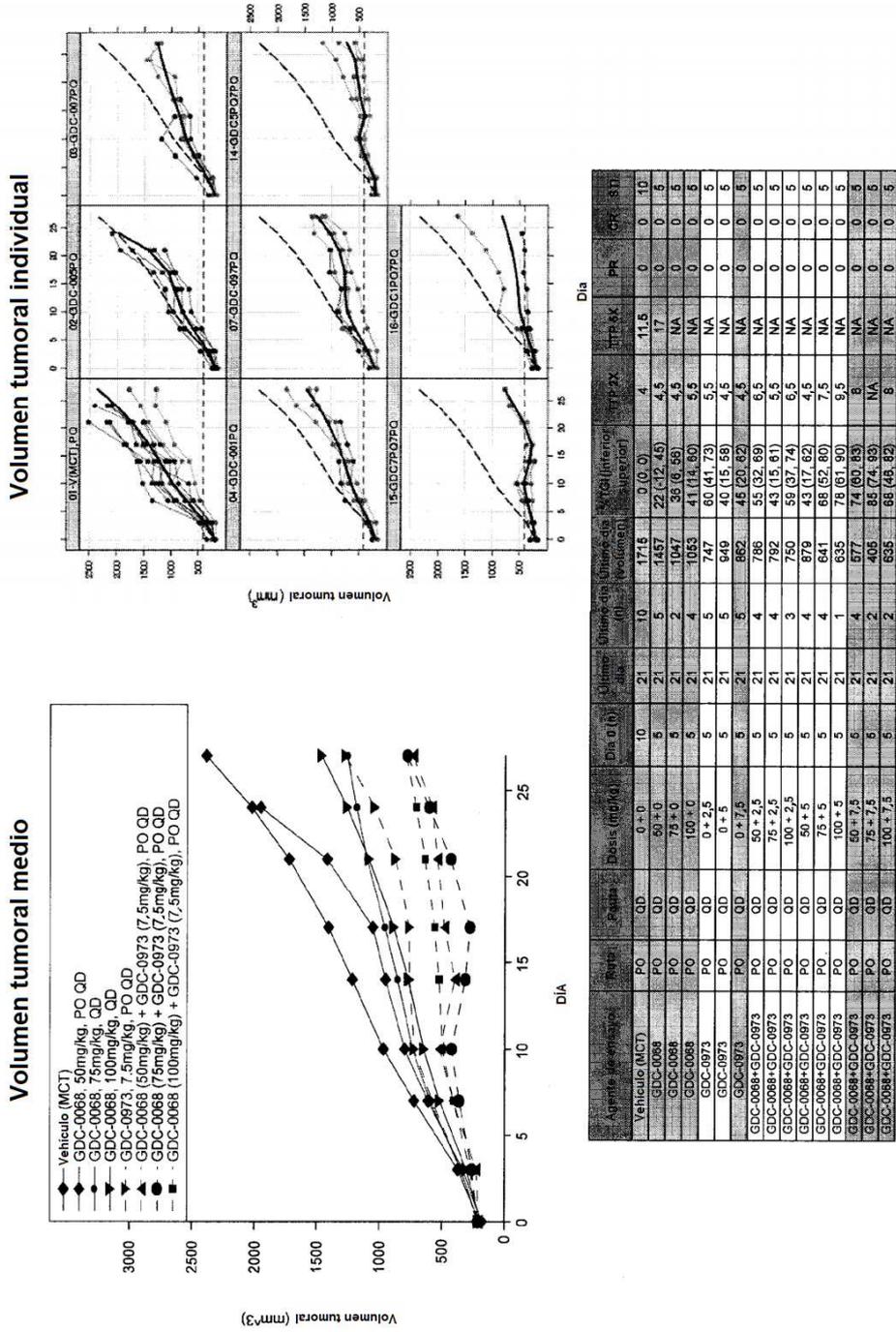


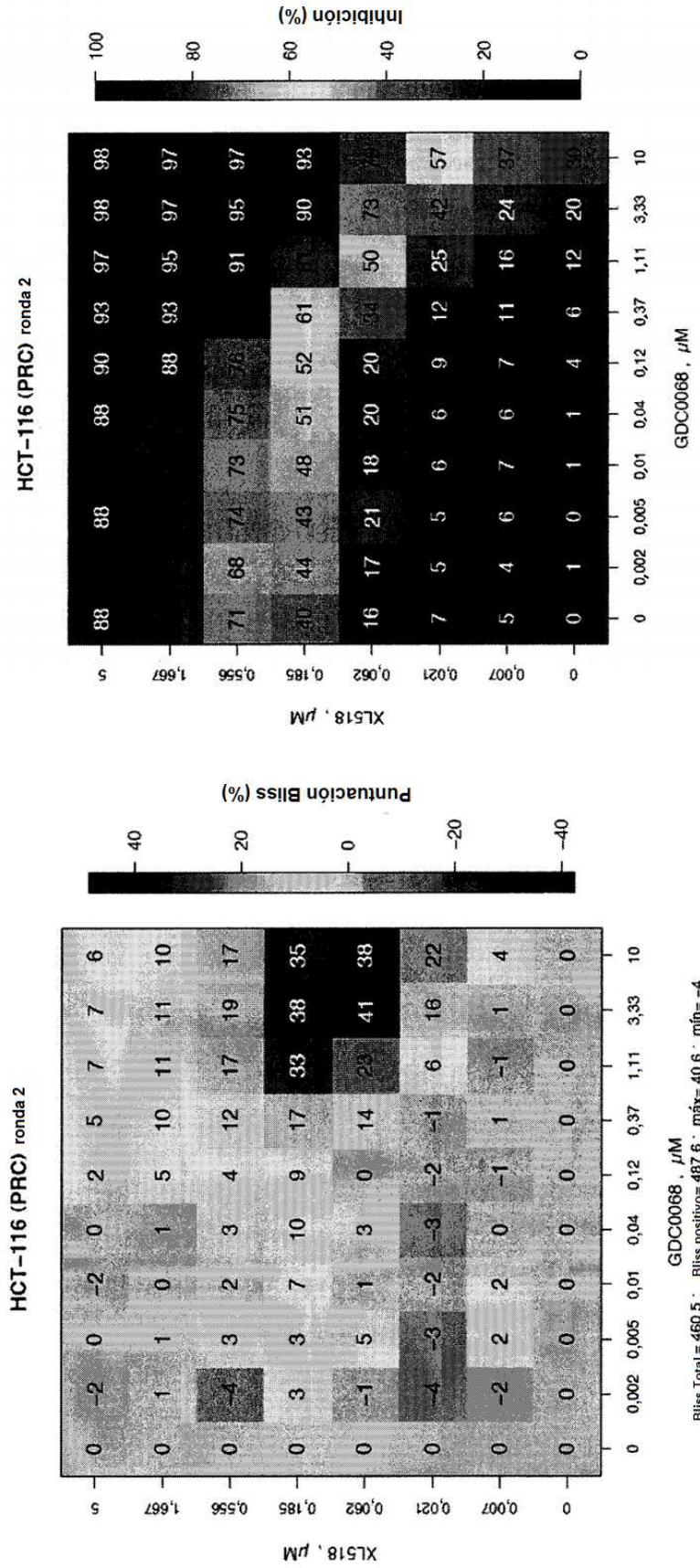
FIG 4 Cáncer colorrectal in vitro

Tejido	Línea celular	Activación de vía Akt	Activación de vía de Ras/Raf	RTK	Otro	CI50		Puntuaciones Bliss	
						GDC-0068	XL-518	Positivos totales	Total
Colon	HCT-116 (PRC)*	PI3K H1047R	Kras G13D		E-Cad, RER+	>10	0,25	288	460
Colon	DLD-1 (PRC)*	PI3K E545K,D549N	Kras G13D		p53, RER+	>10	3,15	367	339
Colon	LS174T (PRC)*	PI3K H1047	Kras G12D		E-Cad, RER+	9,13	0,25	269	242
Colon	HM-7	PI3K H1047	Kras G12D			7,09	0,57	228	140
Colon	LS180	PI3K H1047R, P421L	Kras G12D		RER+	>10	0,08	226	173
Colon	HT-29 (PRC)*	PI3K L568F, L569F,P449T	Braf V600E		p53	>10	0,01	204	201
Colon	SW620 (PRC)*		Kras G12V		RER+	>10	0,11	199	156

Línea celular	subtipo molecular	Activación de PI3K	Activación de MAPK	CI50 de GDC-0068 (uM)	XL518		
					Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
CRC	KM12	PTEN-		2,3	29/6/2009	10/7/2009	17/8/2009
CRC	Lovo	AKT2 mut	KRAS	2,25			
CRC	LS180	PI3K Mut	KRAS	máx		s	
CRC	MDST8	PTEN-	BRAF	máx		s	
CRC	HT-29	PI3K Mut	BRAF	máx			

- Alta frecuencia de mutaciones coexistentes de la vía PI3K y Ras
- Fuerte sinergia observada en células con mutaciones en ambas vías

FIG 5 HCT-116 (Mutante de PI3K y Kras en colon) combinación in vitro de Mek y Akt



Intervalo de puntuación Bliss: GDC-0973 0,021-0,185 μ M, GDC-0068 0,37-10 μ M

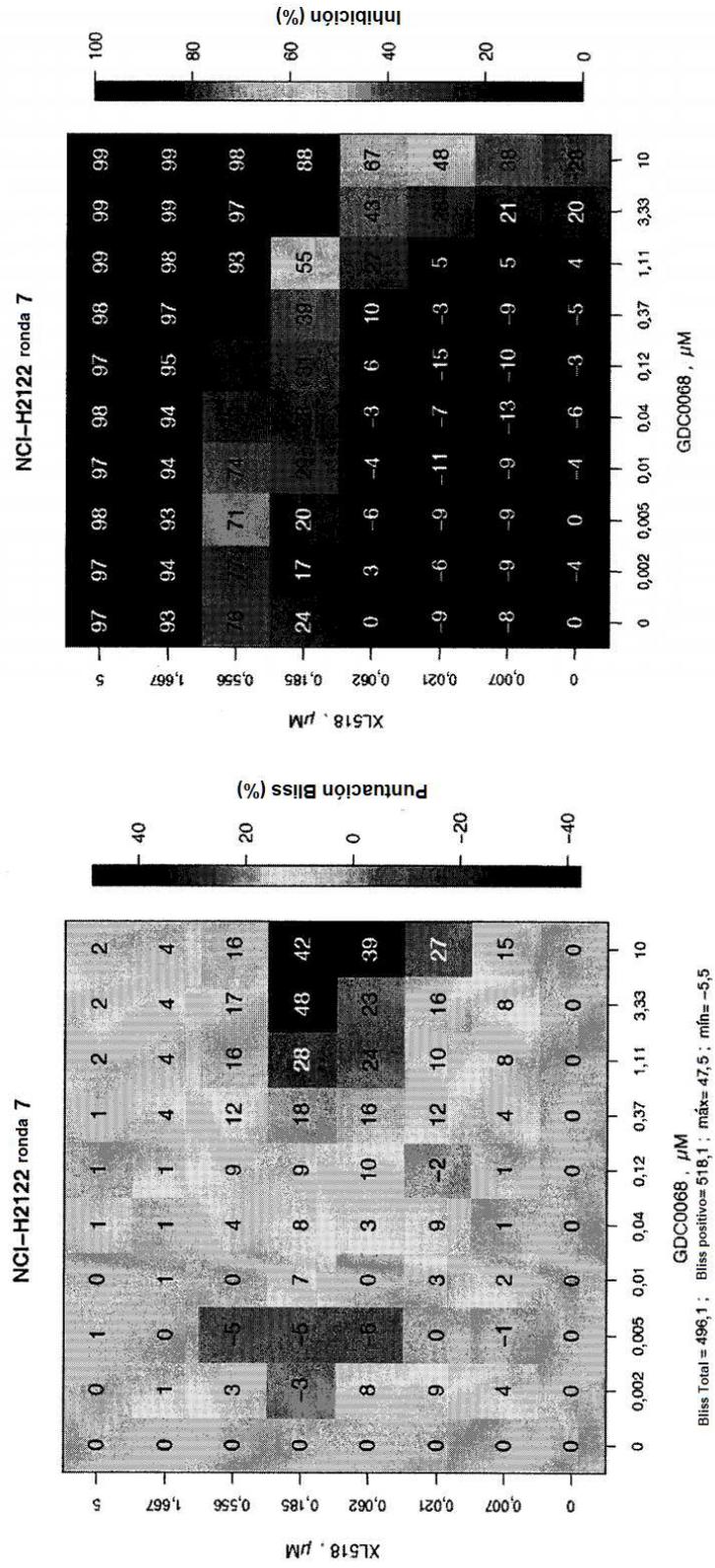
FIG 6 NSCLC

Tejido	Linea celular	Activación de la vía Akt	Activación de Ras/Raf	RTK	otro	CI50		Puntuaciones de Bliss	
						GDC-0068	XL-518	Positivos totales	Total
Pulmón-NSCLC	H460 (PRC)*	PI3K E545K	Kras Q61H	EGFR L933P	LKB1	>10	>5	548	468
Pulmón-NSCLC	NCI-H2122		Kras G12C		p53, LKB1	>10	0.3	518	496
Pulmón-NSCLC	H1299 (PRC)*		Nras Q61K		p53	>10	3.01	529	384
Pulmón-NSCLC	SK-MES-1 (PRC)*	PI3K L997P	Kras N85K		p53	>10	0.50	428	277
Pulmón-NSCLC	MV522 (PRC)*		Braf V600E			>10	0.04	304	125
Pulmón-NSCLC	A549 (PRC)*	PI3K M772X, N996H	Kras G12S		p53, LKB1	>10	0.34	252	180
Linfoblasto B	NCI-BL2122					4.54	>5	12	-549

XL518							
Linea celular	subtipo molecular	Activación de PI3K	Activación de MAPK	GDC-0068 CI50 (uM)	Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
NSCLC	NCI-H2122	WT	KRAS	máx	29/6/2009	10/7/2009	17/8/2009
NSCLC	NCI-H460	PI3K mut	KRAS	máx	s	s	s

- Alta frecuencia de mutaciones coexistentes de la vía PI3K y Ras
- Fuerte sinergia observada en todas las células probadas (incluyendo las células solo con mutaciones Ras/raf sin mutaciones conocidas en la vía PI3K)

FIG 7 H2122 (Mutante de Kras en NSCLC) Combinación In vitro de Mek y Akt



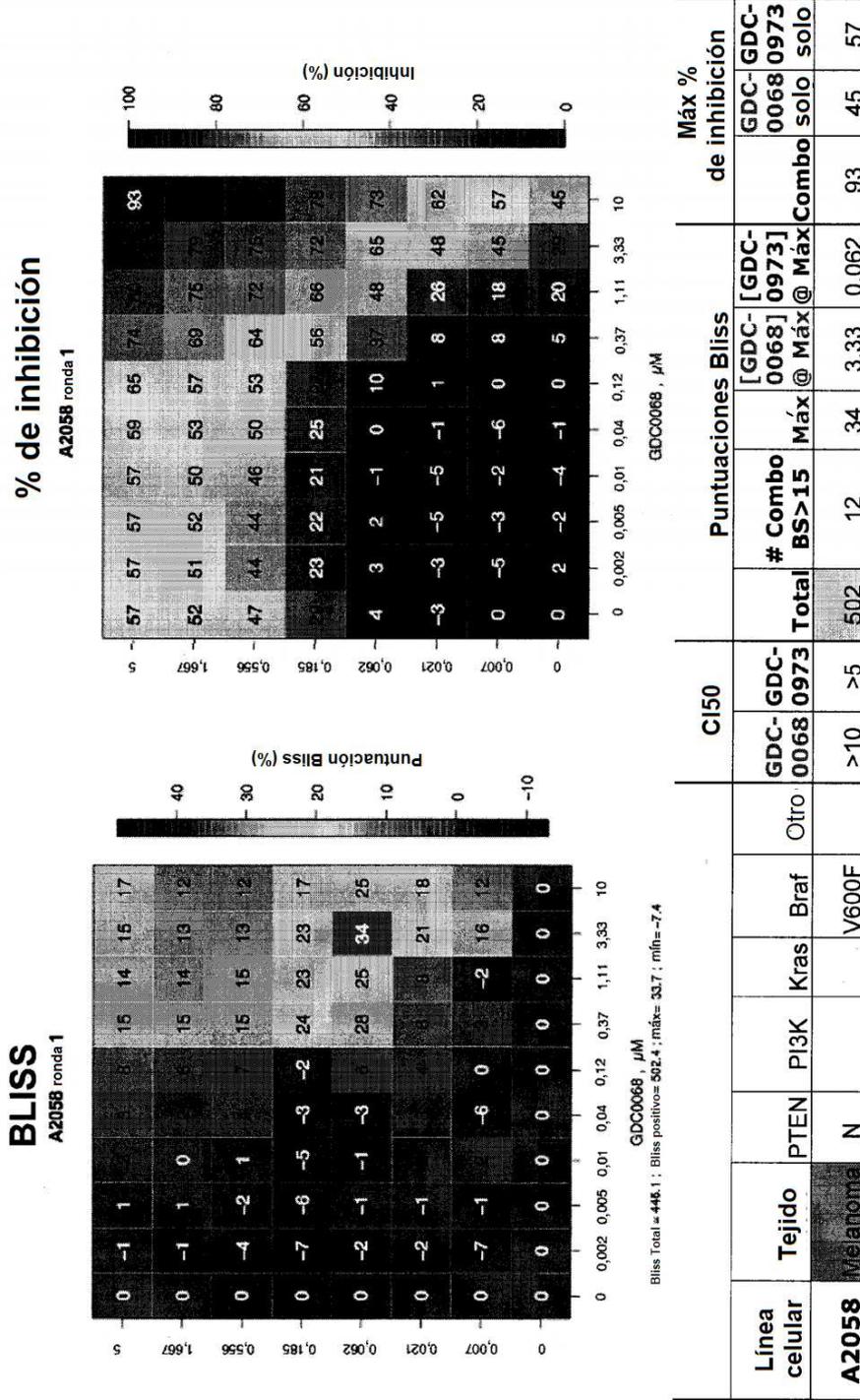
Intervalo de puntuación Bliss: GDC-0973 0,021-0,185 μM , GDC-0068 0,37-10 μM

FIG 8 Melanoma

Tejido	Línea celular	Activación de la vía Akt	Activación de Ras/Raf	RTK	otro	CI50		Puntuaciones de Bliss	
						GDC-0068	XL-518	Positivos totales	Total
Melanoma	MALME3M		Braf V600E			>10	0,07	716	684
Melanoma	A375	Akt3 hi	Braf V600E			>10	0,01	55	548
Melanoma	A2058	PTEN-	Braf V600E		p53	>10	0,6	50	446
Melanoma	537MEL	PTEN-	Braf del,amp			2,33	0,02	434	428
Fibroblasto normal	MALME3					5,02	>5	42	-142

- Predominantemente, la mutación Braf, a menudo coexiste con PTEN, a veces con mutación de PI3K o sobreexpresión de Akt3
- Fuerte sinergia observada en todas las células de melanoma probadas (incluyendo las células solo con mutación Braf sin mutaciones conocidas en las vía PI3K)

**FIG 9 A2058 (Mutante PTEN -/- y Braf (mutante) Combinación In vitro de Mek y Akt
Mínima actividad de agente único In vitro**



Brian B Lee, Kui Lin

Intervalo de puntuación Bliss: GDC-0973 0,021-0,185 uM, GDC-0068 0,37-10 uM

FIG 10 Atenuación génica mejorada de la actividad de ambas vías en comparación con agentes únicos solos

BT474M1 (ER+ mama, PI3K K111N, Her2+, Braf G534D?)

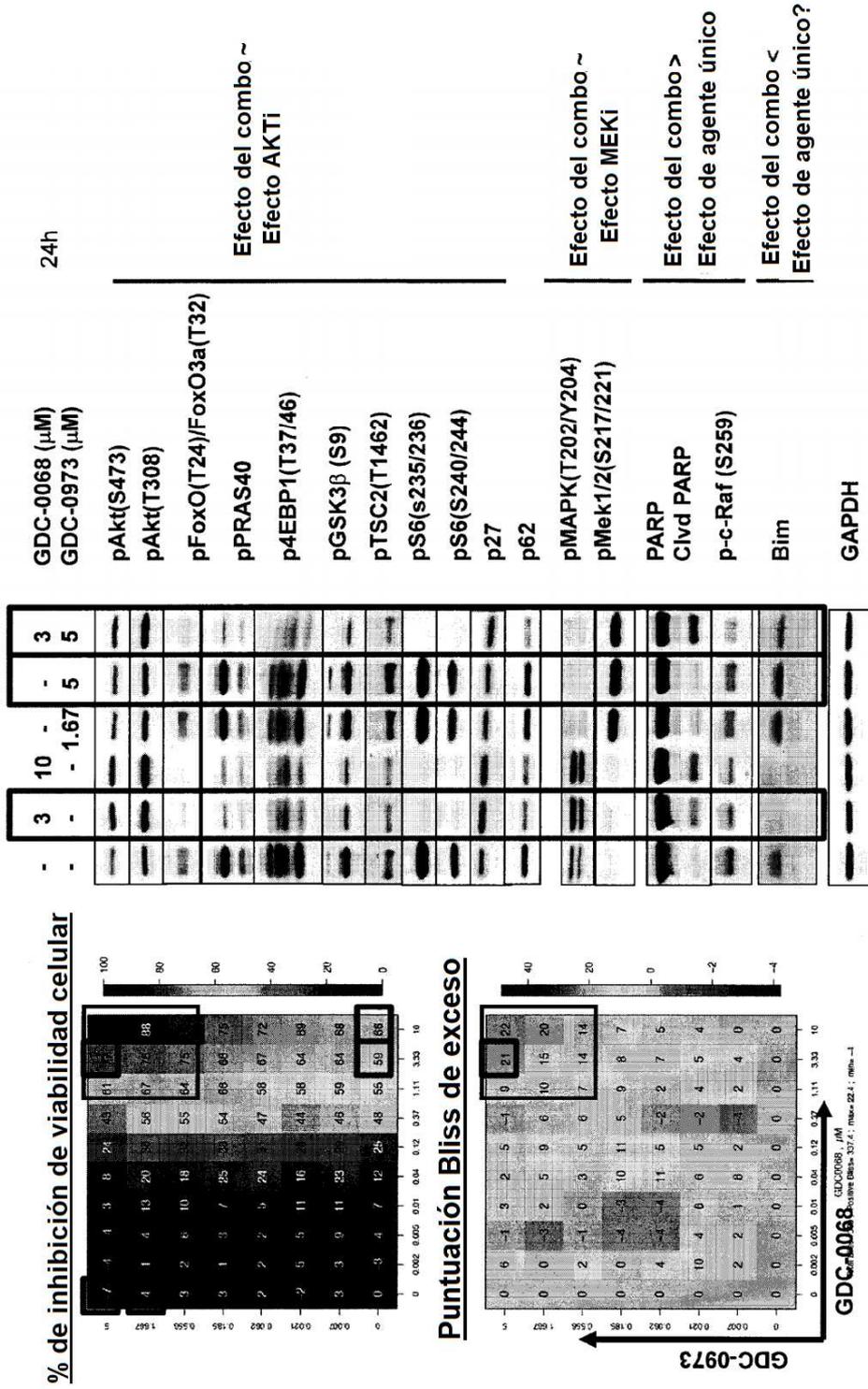


FIG 12 Combinación GDC0973 (MEKi) + GDC0068

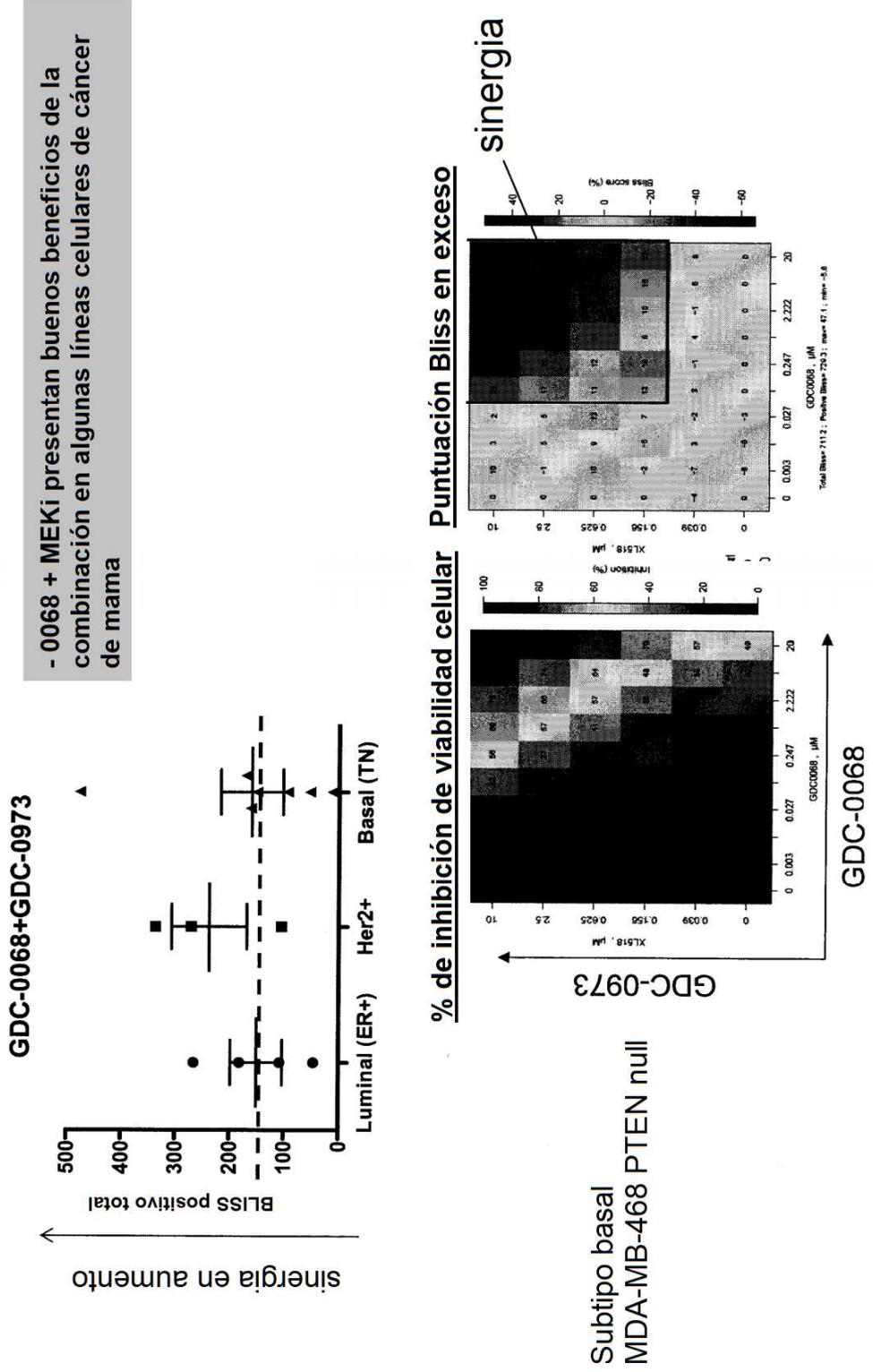


FIG 13 Ovario

Tejido	Línea celular	Activación de vía Akt Ras/Raf	RTK	Otro	CI50		Bliss Scores	
					GDC-0068	XL-518	Positivos totales	Total
Ovario	OVCAR-3	PI3Kp110amp, p85mut, Akt2amp		p53	9,04	>5		573
Ovario	PE01	ND	ND	ND			1,81	334
Ovario	TOV-21G	PTEN-, PI3K H1047Y	Kras G13C		0,67	2,48		282
Ovario	SK-OV-3 (PRC)*	PI3K H1047R				>5		239
Ovario	IGROV1	PI3K O1069W		p53	0,66	0,39		211
Ovario	A2780 (PRC)*	PTEN mut					0,98	43
Ovario	OV-90	Braf del		p53,p16	9,19	0,39		107

Línea celular	Subtipo molecular	Activación de PI3K	Activación de MAPK	CI50 de GDC-0068 (uM)	XL518		
					Ronda 1	Ronda 2	Ronda 3
Ovario	TOV21G	PTEN/PI3K	KRAS	0,558	29/6/2009	10/7/2009	17/8/2009
Ovario	CAOV3	PIK3CA 4 copias		máx			
Ovario	EFO27	PTEN		0,55			
Ovario	OVCAR3	AKT2 amp		1,44			
Ovario	SKOV3	PI3K		máx			s

- Baja frecuencia de mutaciones coexistentes de la vía PI3K y Ras
- La activación de Raf-1 y de A-Raf pero no de Braf están implicadas en los cánceres de ovario
- Sinergia observada en células sin mutaciones Ras/Raf conocidas, incluyendo células resistentes a solo GDC-0068 o ambos agentes

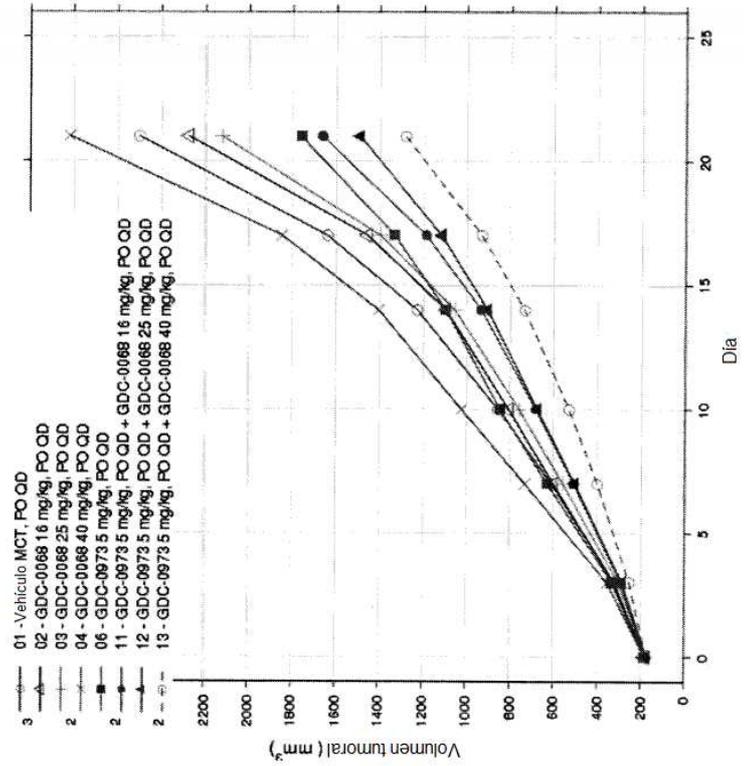
FIG 14 Próstata

		XL518						
	línea celular	Subtipo molecular	Activación de PI3K	Activación de MAPK	CI50 de GDC-0068 (uM)	Ronda 1 29/6/2009	Ronda 2 10/7/2009	Ronda 3 17/8/2009
próstata	22RV1		PI3K Mut	BRAF	9,09		\$	
próstata	DU145		WT		máx			
próstata	PC3		PTEN-		2,26			
próstata	PC3MLN4		PTEN-		11,03			
					CI50 > 5			

- Baja frecuencia de mutaciones coexistentes de la vía PI3K y Ras
- Sinergia observada con una línea con ambas mutaciones PI3K y Braf

FIG 15 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de mama MX-1

GDC-0973 5 mg/kg QD



GDC-0973 15 mg/kg Q3D

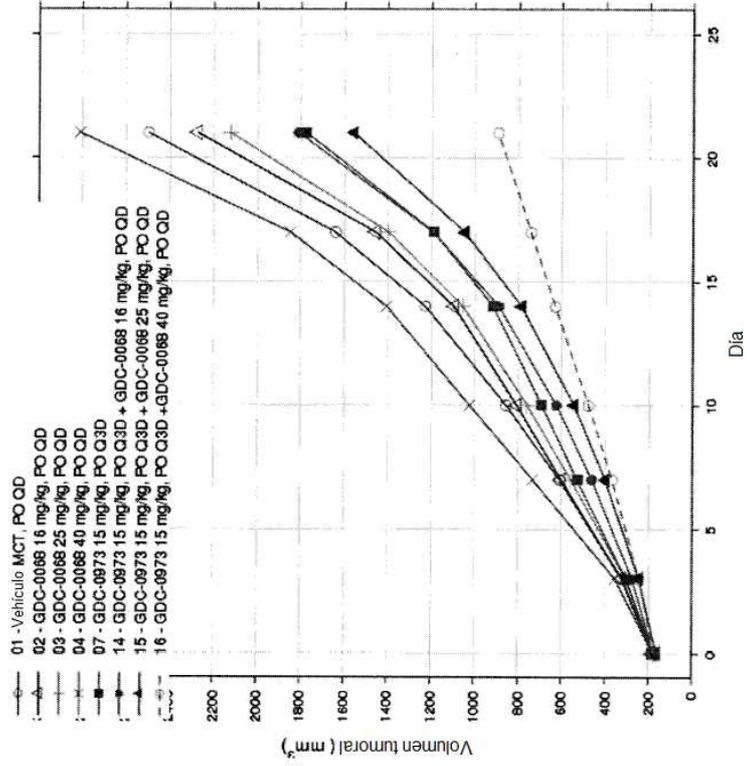


FIG 16 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de NSCLC H2122

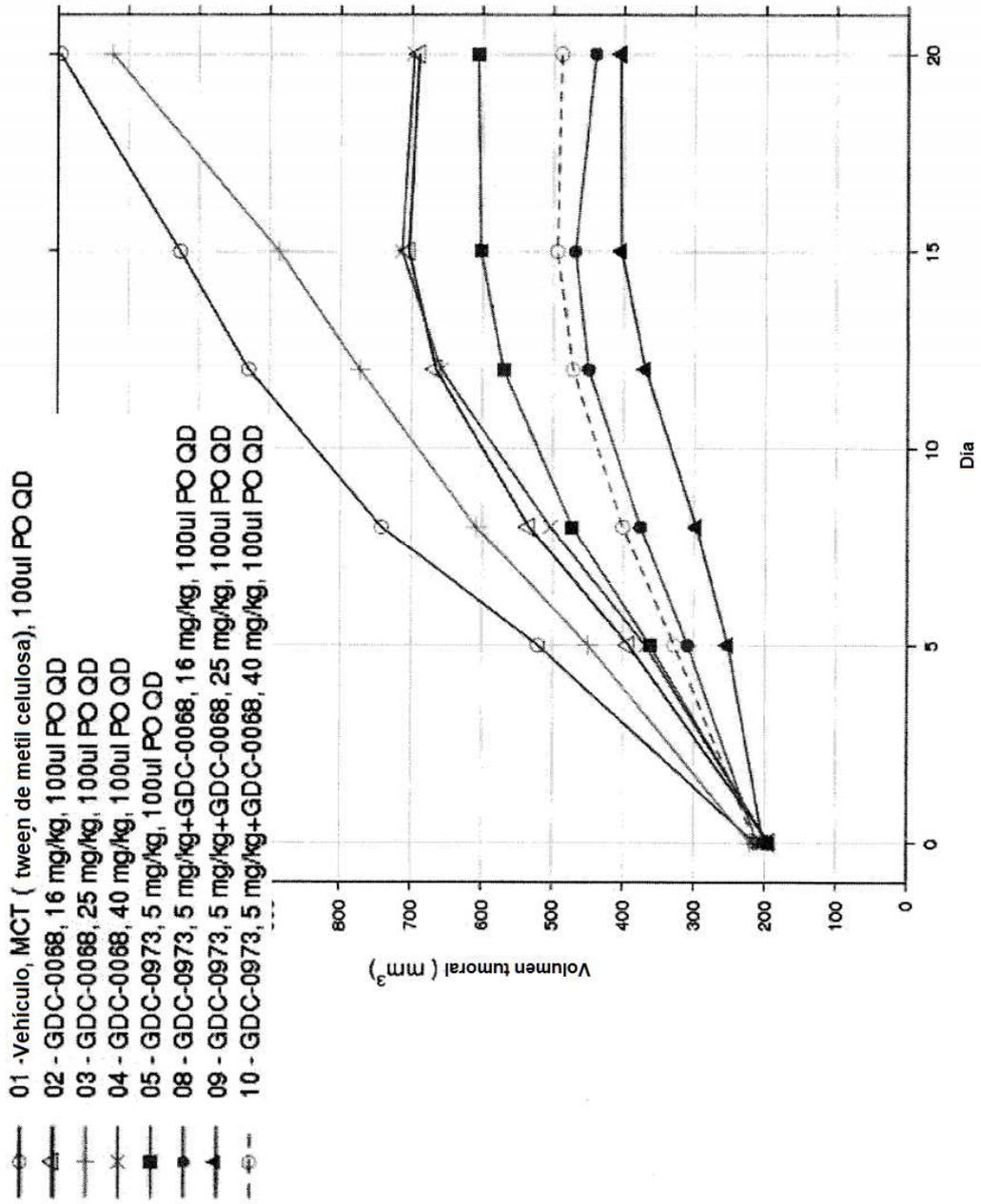


FIG 17 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de páncreas SW1990

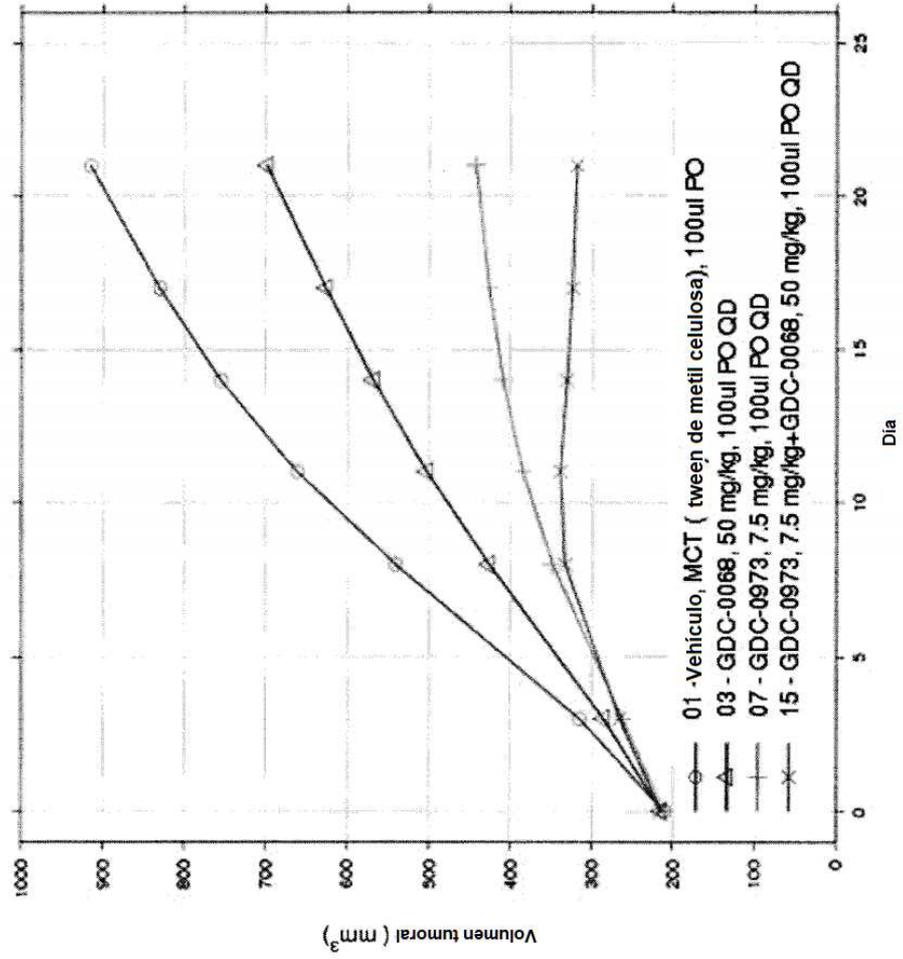


FIG 18 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de páncreas Pa_Tu-8902

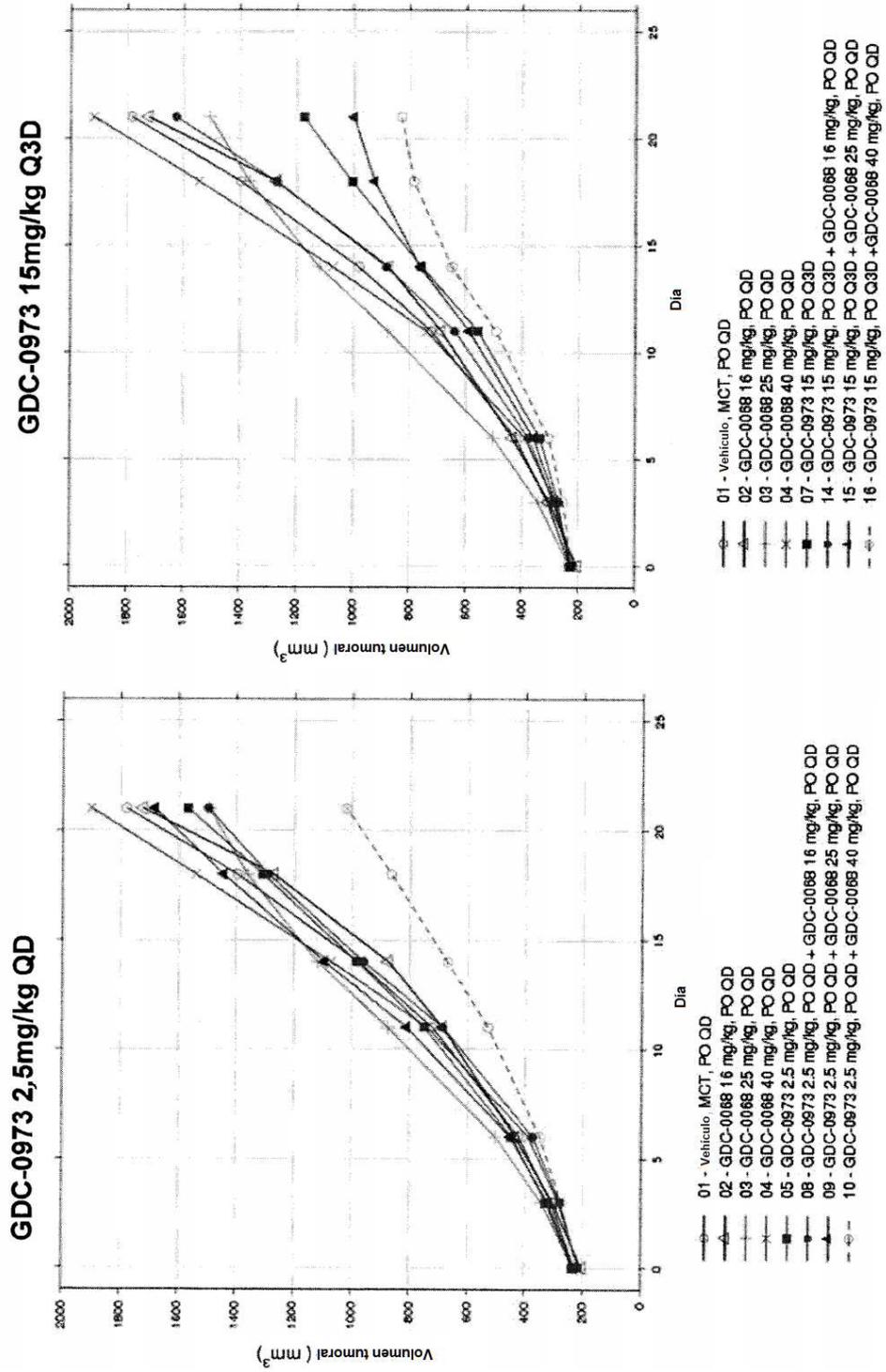


FIG 19 GDC administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de melanoma 537Mel

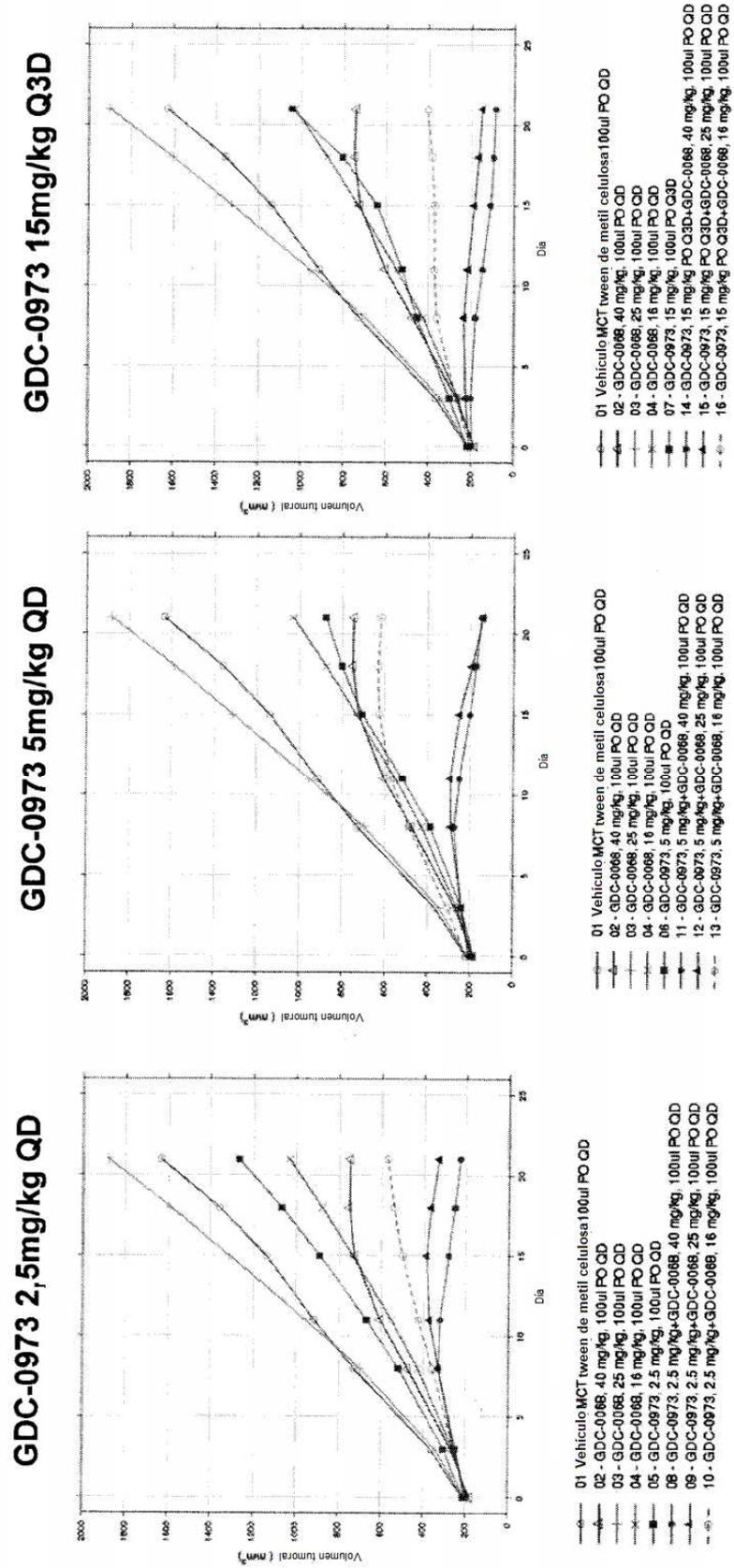


FIG 20 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores de melanoma A2058

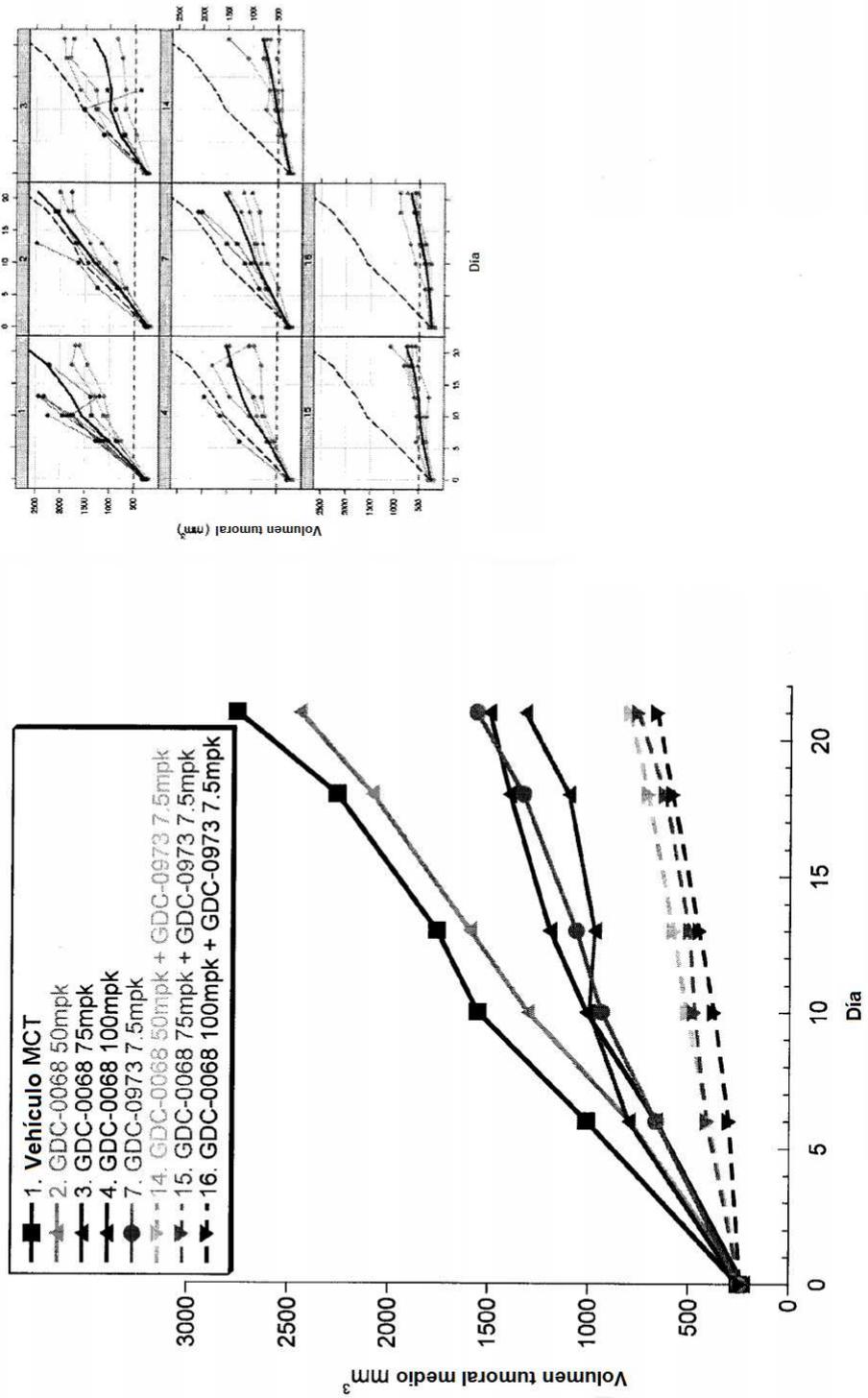


FIG 21 GDC-0068 administrado PO + GDC-0973 (inhibidor de MEK) en tumores colorrectales HCT-116

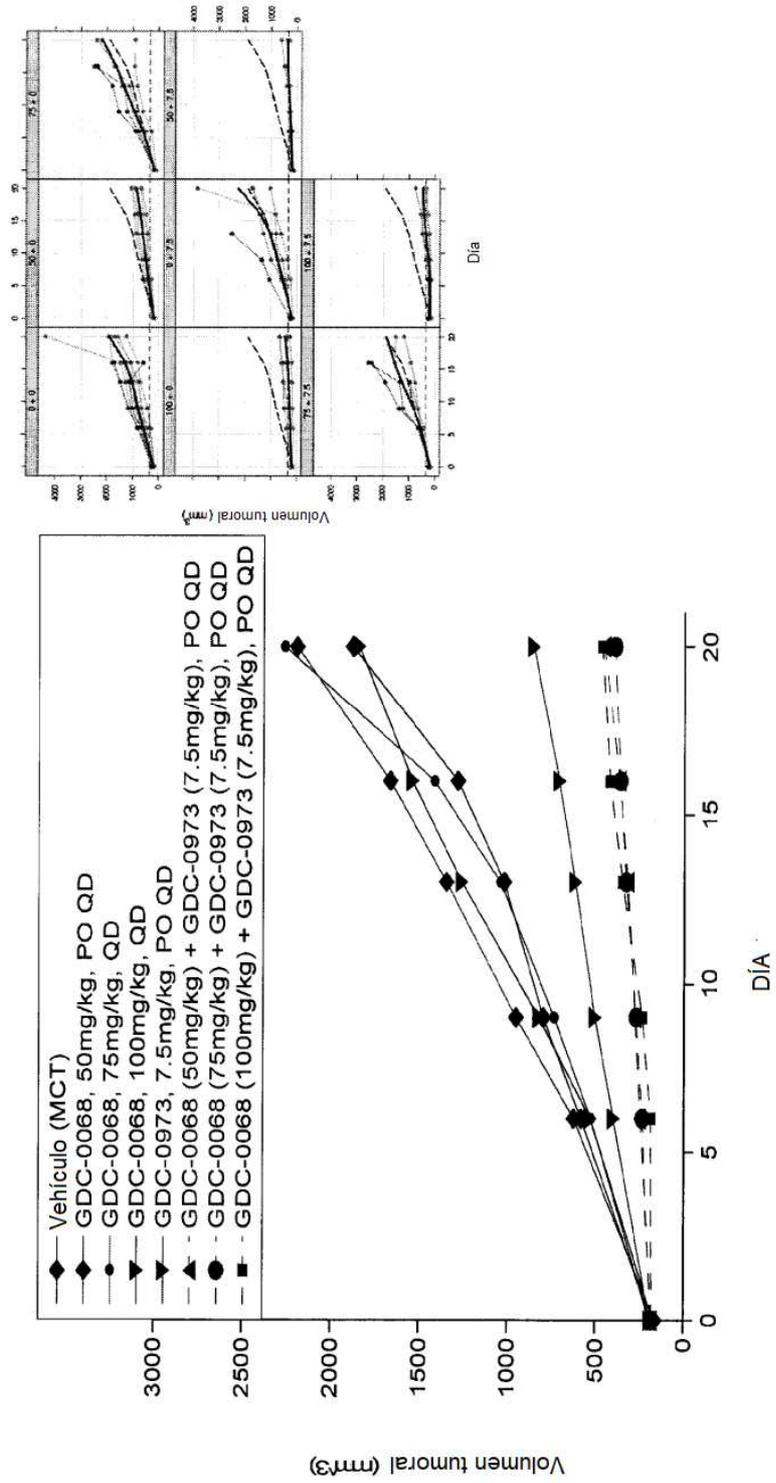


FIG 22b Sinergia de la combinación GDC-0068 y GDC-0973 en múltiples líneas celulares

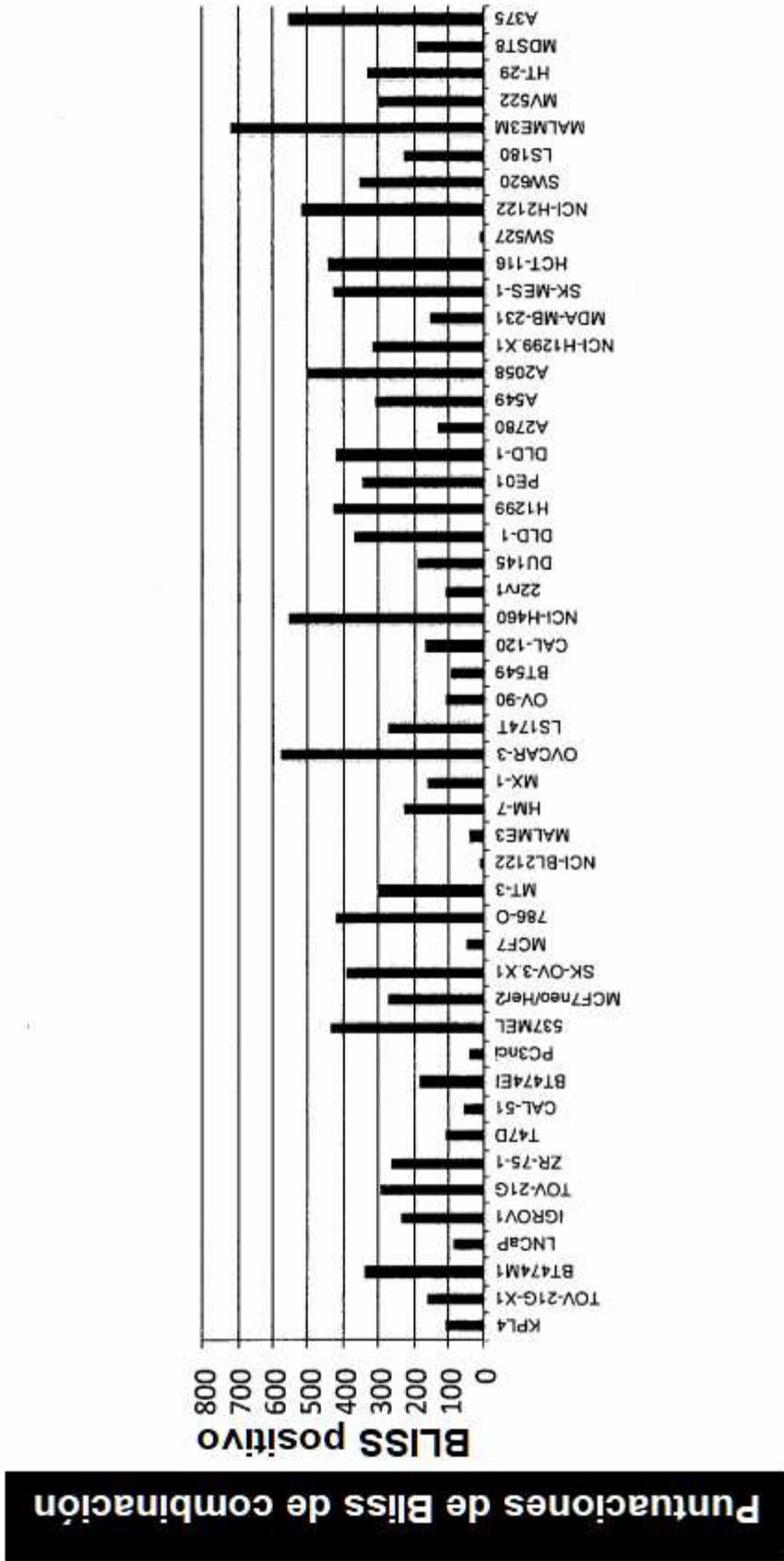


FIG 24

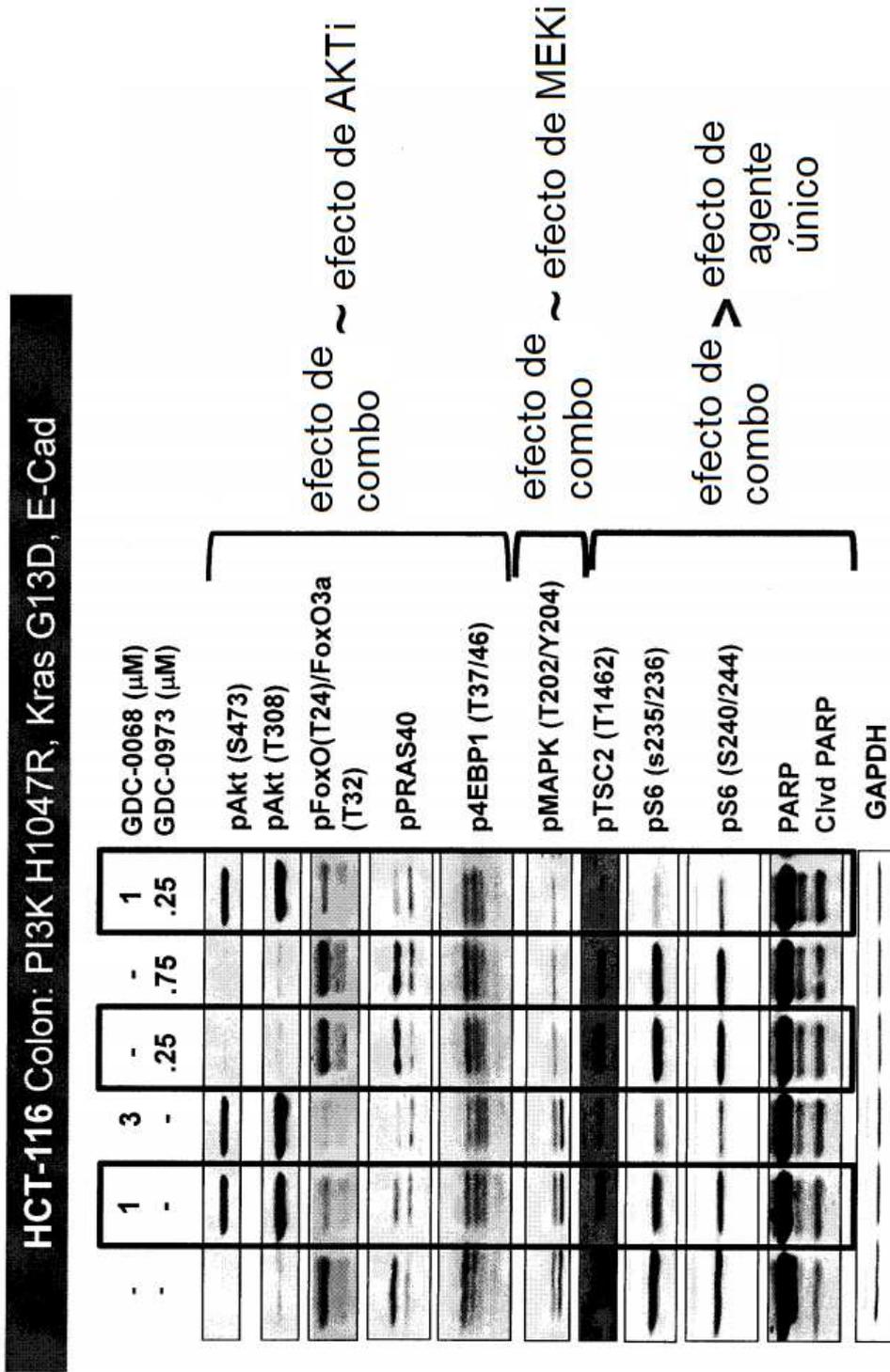
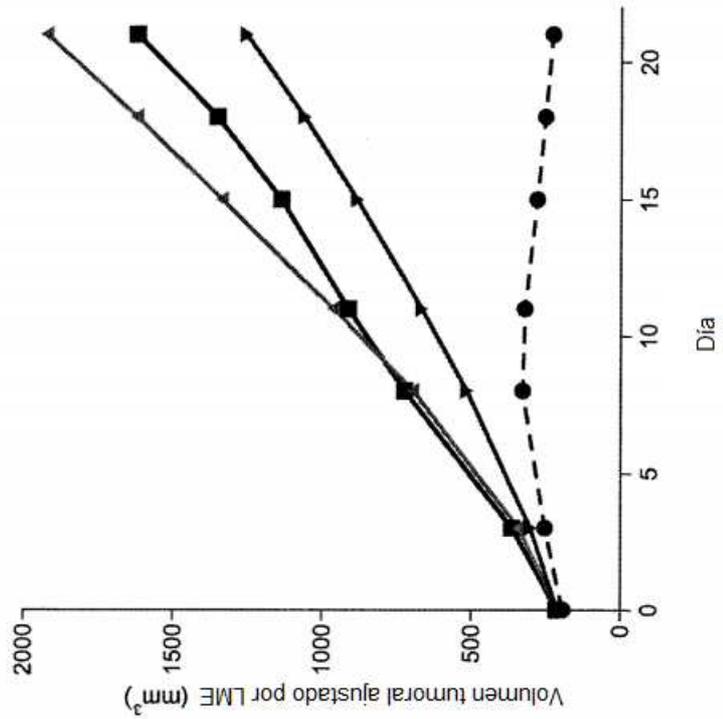


FIG 25

537MEL Melanoma: PTEN null Braf amp/del



Se observa TGI en los grupos de combinación

- **La TGI de la combinación es el 81 %**
- La TGI de la actividad de GDC-0068 de agente único es <0 %
- La TGI de GDC-0973 de agente único es el 30 %

FIG 26

Cambios significativos en niveles de expresión de fosfoproteína frente al control del vehículo

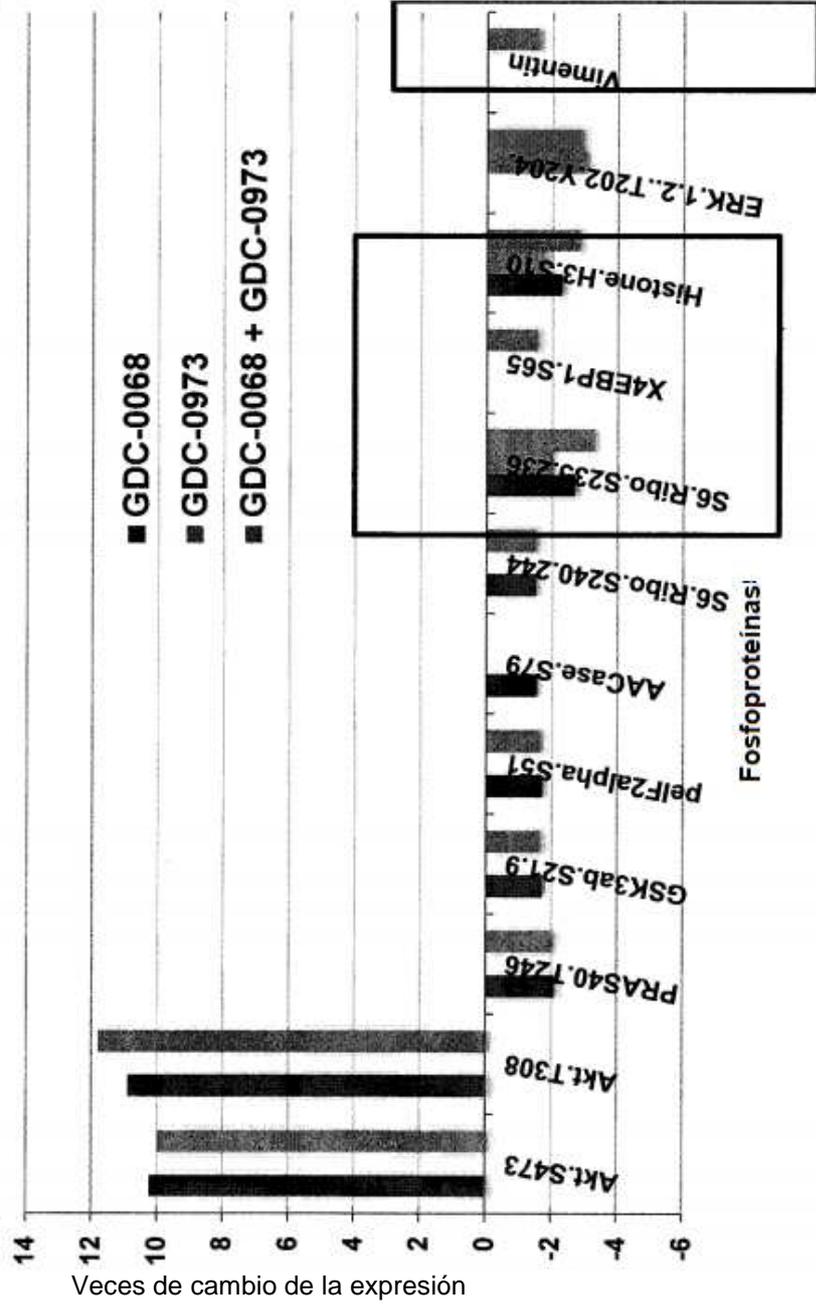


FIG 27

Cambios significativos en niveles de expresión de fosfoproteína en la combinación frente a cualquiera de los agentes únicos

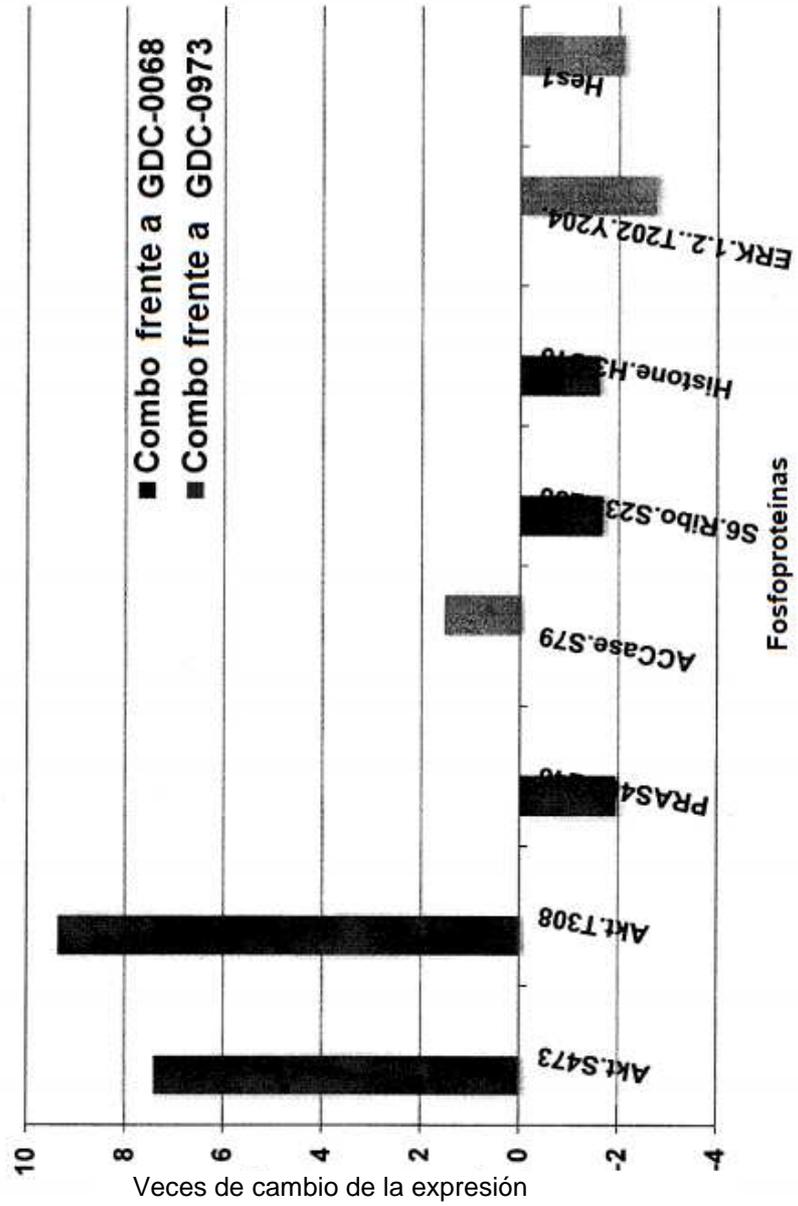


FIG 28

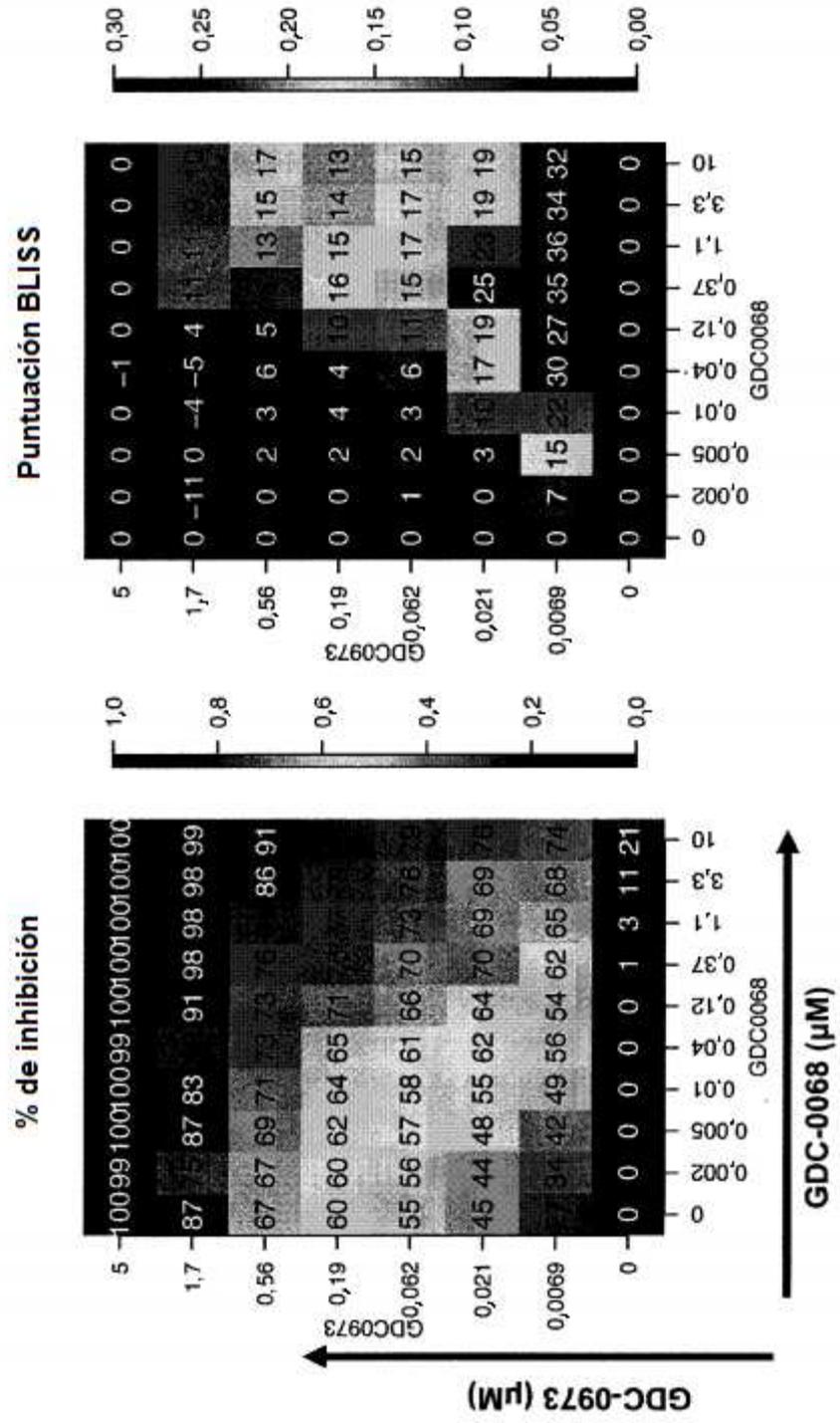


FIG 29

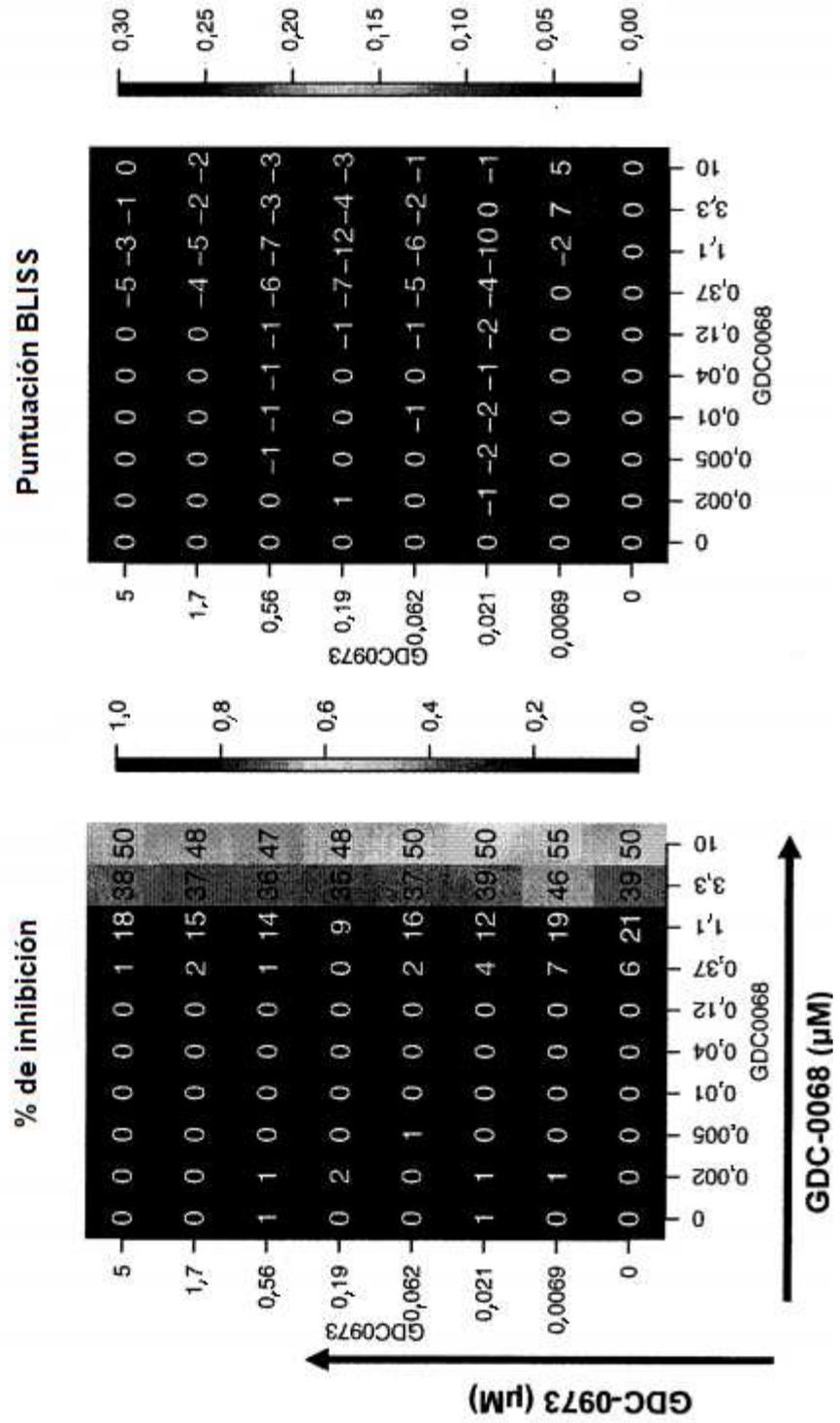
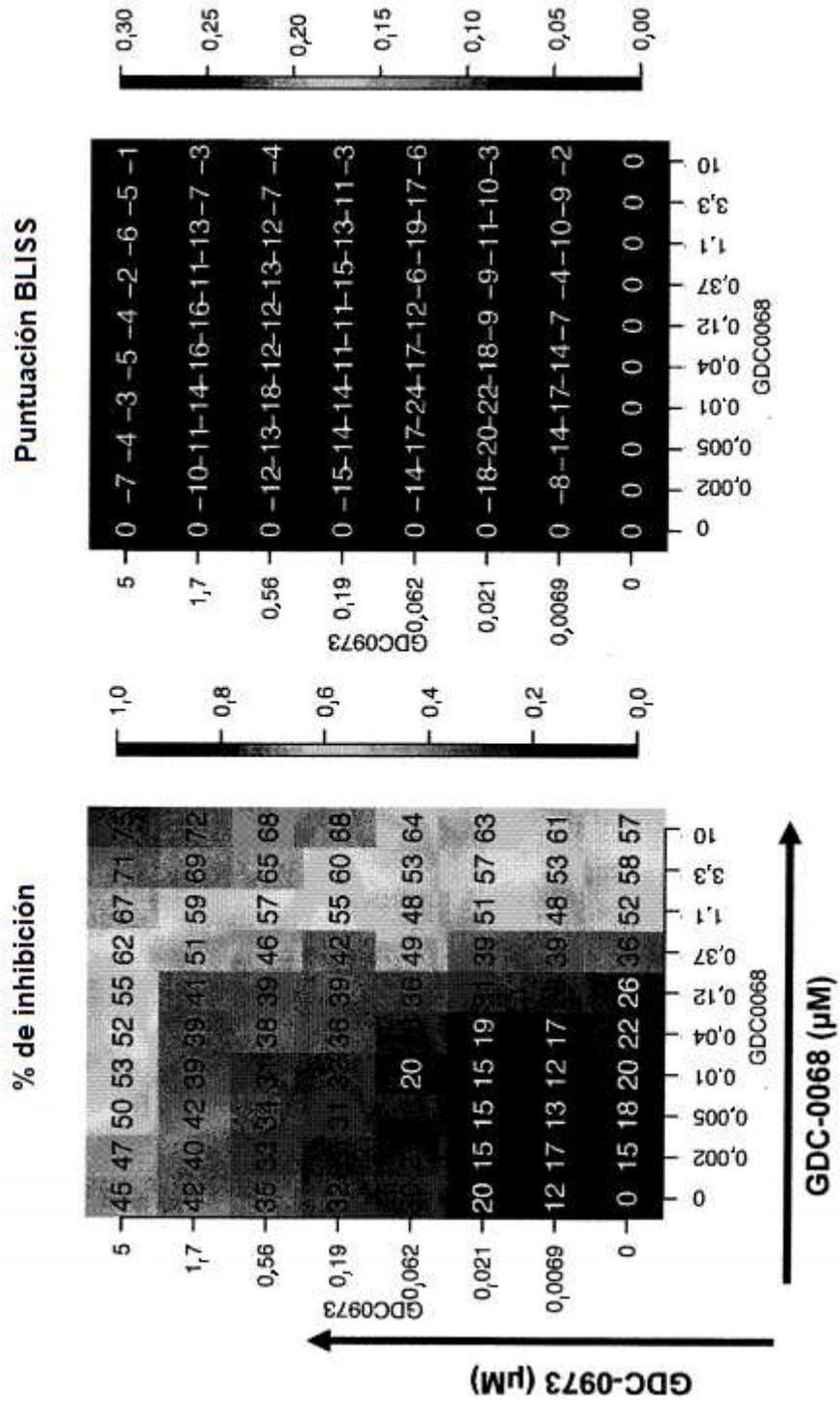


FIG 30



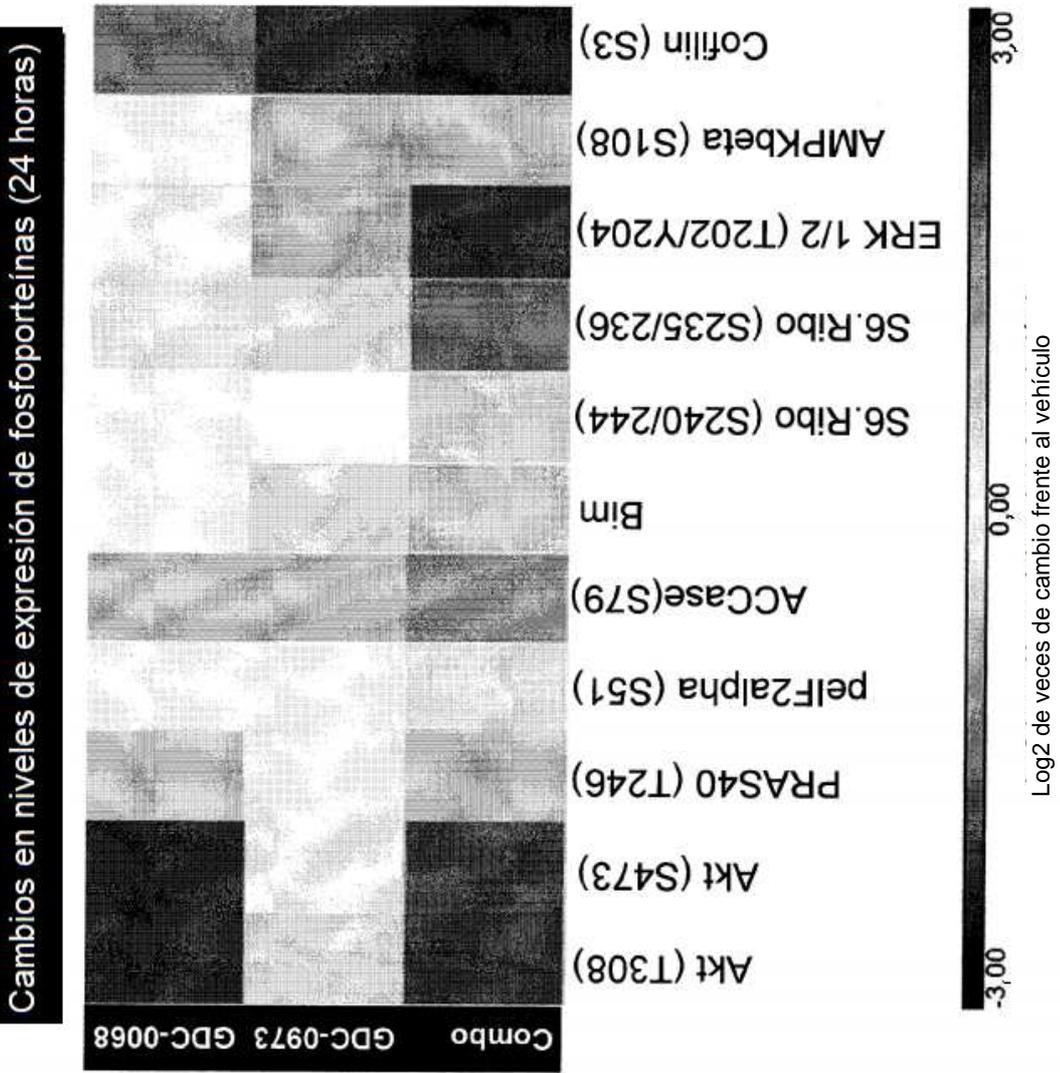


FIG 31