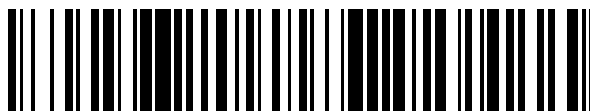


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 395**

51 Int. Cl.:

**C07D 413/14** (2006.01)

**A61K 31/4245** (2006.01)

**A61K 31/4196** (2006.01)

**A61K 31/497** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2014 PCT/GB2014/050163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014 WO14114928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2014 E 14701828 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2948447**

54 Título: **Compuestos químicos**

30 Prioridad:

**23.01.2013 EP 13305078**

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

**10.04.2017**

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (100.0%)  
SE-151 85 Södertälje, SE**

72 Inventor/es:

**BARLAAM, BERNARD CHRISTOPHE;  
BERRY, DAVID;  
DELOUVRIE, BENEDICTE;  
HARRIS, CRAIG STEVEN;  
LAMBERT-VAN DER BRÉMPPT, CHRISTINE MARIE  
PAUL;  
OUVRY, GILLES;  
REID, GARY PATRICK y  
TOMKINSON, GARY PETER**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 608 395 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

## Compuestos químicos

La invención se refiere a ciertos derivados de aminopirazina novedosos, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, que poseen actividad anti-cáncer y, por lo tanto, son útiles en métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal. La invención también se relaciona con procesos para la fabricación de dichos derivados de aminopirazina, composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso en métodos terapéuticos, por ejemplo en la fabricación de medicamentos para su uso en la prevención o el tratamiento de cánceres en un animal de sangre caliente tal como el hombre, incluyendo el uso en la prevención o el tratamiento de cáncer.

La presente invención también se refiere a derivados de aminopirazina que son inhibidores selectivos de la familia de enzimas PI3-quinasas (que es de forma alternativa conocida como la familia fosfatidilinositol-3-quinasa o familia PI3K), particularmente de las isoformas PI3K- $\alpha$  y PI3K- $\delta$ , y son, por ejemplo, útiles para terapia anti-tumoral.

En el campo del cáncer, en los últimos años se ha descubierto que una célula puede volverse cancerosa por la transformación de una porción de su ADN en un oncogén, es decir, un gen que, cuando se activa, conduce a la formación de células tumorales malignas (Bradshaw, *Mutagenesis* 1986, 1, 91). Varios de dichos oncogenes dan origen a la producción de péptidos, que son quinastas, una clase de enzimas que son capaces de fosforilar su proteína o sustratos lípidos. Existen varias clases de quinastas.

En primer lugar, están las tirosina quinastas, que pueden ser tirosina quinastas receptoras o tirosina quinastas no receptoras. Se conocen varias clases de tirosina quinastas receptoras (Wilks, *Advances in Cancer Research*, 1993, 60, 43-73) en base a las familias de factores de crecimiento, que pueden unirse a la superficie extracelular de diferentes tirosina quinastas receptoras; por ejemplo, la clasificación incluye las tirosina quinastas receptoras de Clase I que comprenden la familia EGF de tirosina quinastas receptoras. Las tirosina quinastas no receptoras se localizan intracelularmente y se conocen varias clases de tirosina quinastas no receptoras que incluyen la familia Src, tales como las tirosina quinastas Src, Lyn, Fyn y Yes.

En segundo lugar, ciertas quinastas pertenecen a la clase de serina/treonina quinastas que también se localizan intracelularmente. Las vías de señalización de serina/treonina quinasa incluyen la cascada Raf-MEK-ERK y aquellas corriente abajo de la PI3-quinasa, tales como PDK-1, AKT y mTOR (Blume-Jensen and Hunter, *Nature*, 2001, 411, 355).

También se sabe que ciertas otras quinastas pertenecen a la clase de quinastas lipídicas, que se localizan intracelularmente y participan, para las quinastas mencionadas anteriormente, en la transmisión de señales bioquímicas, tales como aquellas que afectan el crecimiento de las células tumorales y la invasividad. Se conocen varias clases de quinastas lipídicas que incluyen la familia PI3-quinasa mencionada anteriormente.

Se sabe ahora que la desregulación de oncogenes y genes supresores de tumores contribuye con la formación de tumores malignos, por ejemplo mediante el aumento de la proliferación celular o el aumento de la supervivencia celular. Actualmente también se sabe que las vías de señalización mediadas por la familia PI3-quinasa juega un papel fundamental en distintos procesos celulares, incluidas la proliferación y supervivencia, y la desregulación de estas vías constituye un factor causante en una amplia gama de cánceres humanos y otras enfermedades (Katso et al., *Annual Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, 17: 615-617 y Foster et al., *J. Cell Science*, 2003, 116: 3037-3040).

La familia PI3-quinasa de quinastas lipídicas es un grupo de enzimas que fosforila la posición 3 del anillo de inositol de fosfatidilinositol (PI). Se conocen tres grupos principales de enzimas PI3-quinastas que se clasifican de acuerdo con su especificidad de sustrato fisiológico (Vanhaesebroeck et al., *Trends in Biol. Sci.*, 1997, 22, 267; Engleman et al., *Nature Review Genetics*, 2006, 7, 607). La Clase III de enzimas PI3-quinastas fosforila solamente PI. Por el contrario, la Clase II de enzimas PI3-quinastas fosforilan tanto PI como PI4-fosfato [abreviado en la presente más adelante PI(4)P]. La Clase I de enzimas PI3-quinastas fosforila PI, PI(4)P y PI4,5-bisfosfato [abreviado en la presente más adelante PI(4,5)P<sub>2</sub>], aunque se cree que solo PI(4,5)P<sub>2</sub> es el sustrato celular fisiológico. La fosforilación de PI(4,5)P<sub>2</sub> produce el segundo mensajero lipídico PI3,4,5-trifosfato [abreviado en la presente más adelante PI(3,4,5)P<sub>3</sub>]. Integrantes de esta superfamilia con una relación más lejana son las quinastas de la Clase IV, tales como la mTOR y la proteína quinasa dependiente del ADN que fosforila residuos de serina/treonina en sustratos proteicos. Las más estudiadas y comprendidas de estas quinastas lipídicas son las enzimas PI3-quinastas de la Clase I.

Las PI3-quinastas de Clase I son heterodímeros que consisten en una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora, y la familia se divide además en enzimas de Clase Ia y Clase Ib en base a las parejas reguladoras y al mecanismo de regulación (Engleman et al., *Nature Review Genetics*, 2006, 7, 607). Las enzimas de Clase Ia consisten en tres subunidades catalíticas distintas (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , por nomenclatura definen la isoforma de PI3-quinasa como  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ , respectivamente) que se dimerizan con cinco subunidades reguladoras distintas (p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p55 $\gamma$ ), siendo capaces todas las subunidades catalíticas de interactuar con todas las subunidades reguladoras para formar una variedad de heterodímeros. Las enzimas PI3-quinastas de Clase Ia generalmente se activan en respuesta a la estimulación por parte del factor del crecimiento de receptores tirosina quinastas a través de la interacción de sus dominios de subunidad reguladora SH2 con residuos de fosfo-tirosina específicos de las proteínas receptoras o adaptadoras activadas, tales como IRS-1. Tanto la p110 $\alpha$  como la p110 $\beta$  se expresan ampliamente en todos los tipos

de células y tejidos, mientras que la expresión de la p110 $\delta$  se encuentra más restringida a las poblaciones de leucocitos y algunas células epiteliales. Por el contrario, la enzima de Clase Ib simple consiste en una subunidad catalítica p110 $\gamma$  que interactúa con una subunidad reguladora p101. Asimismo, la enzima de Clase Ib se activa en respuesta a los sistemas del receptor acoplado a la proteína G (GPCR), así como mediante los mecanismos descritos anteriormente.

5 Actualmente existe considerable evidencia que indica que las enzimas PI3-quinasa de Clase Ia participan en la tumorigénesis de una amplia gama de cánceres humanos, ya sea directamente o indirectamente (Vivanco and Sawyers, Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501). En particular, el gen PIK3CA que codifica la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de PI3-quinasa está ampliamente relacionado con la tumorigénesis. Las activaciones de las mutaciones puntuales, que se encuentran más frecuentemente en los dominios helicoidales o catalíticos de p110 $\alpha$ , aumentan la actividad de la PI3-quinasa de la holoenzima y pueden transformar las células. Se han reportado, particularmente, como mutaciones somáticamente naturales en frecuencias considerables en un amplio rango de tipos de tumor (Samuels et al., Science, 2004, 304, 554; Samuels et al., Cancer Cell, 2005, 7, 561; Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607; Zhao L and Vogt PK, Oncogene 2008, 27 5486). También se han identificado mutaciones relacionadas con tumores en p85 $\alpha$  en cánceres tales como cáncer de ovario y colon (Philp et al., Cancer Research, 2001, 61, 7426-7429). Más aún, la subunidad p110 $\alpha$  se amplifica en algunos tumores, como los de ovario (Shayesteh et al., Nature Genetics, 1999, 21, 99-102) y cuello de útero (Ma et al., Oncogene, 2000, 19, 2739-2744).

Además de su participación en efectos directos, se cree que la activación de la PI-3-quinasa de Clase Ia participa en eventos tumorigénicos que se producen corriente arriba en las vías de señalización, por ejemplo mediante la activación de receptores tirosina quinasa dependientes o independientes de ligandos, sistemas GPCR o integrinas (Vara et al., Cancer Treatment Reviews, 2004, 30, 193-204). Ejemplos de dichas vías de señalización corriente arriba incluyen la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa Erb2 en una variedad de tumores, lo que conduce a la activación de las vías mediadas por PI 3-quinasa (Harari et al., Oncogene, 2000, 19, 6102-6114) y la sobreexpresión del oncogén ras (Kauffmann-Zeh et al., Nature, 1997, 385, 544-548). Además, las PI3-quinasas de Clase Ia pueden contribuir con la tumorigénesis causada por distintos eventos de señalización corriente abajo. Por ejemplo, la pérdida del efecto de la fosfatasa supresora de tumores PTEN, que cataliza la conversión de PI(3,4,5)P3 de nuevo en PI(4,5)P2, se asocia con una amplia gama de tumores a través de la desregulación de la producción de PI(3,4,5)P3 mediada por la PI3-quinasa (Simpson and Parsons, Exp. Cell Res., 2001, 264, 29-41). Más aun, se cree que el aumento de los efectos de otros eventos de señalización mediados por la PI3-quinasa contribuye con una variedad de cánceres, por ejemplo, mediante la activación de Akt (Nicholson and Anderson, Cellular Signalling, 2002, 14, 381-395).

30 De esta forma, la desregulación común de la PI3-quinasa junto con las de las vías de señalización corriente arriba y corriente abajo hacen que colectivamente sea una de las vías más comúnmente desreguladas en el cáncer humano (Hennessey et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4, 988).

Además de su participación en la mediación de la señalización proliferativa y de supervivencia en células tumorales, también existe buena evidencia que demuestra que las enzimas PI3-quinasas de Clase Ia también contribuyen con la tumorigénesis mediante su función en células estromales asociadas a tumores. Por ejemplo, se sabe que la señalización de la PI3-quinasa tiene un papel importante en la mediación de eventos angiogénicos en células endoteliales en respuesta a factores pro-angiogénicos tales como VEGF (Abid et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2004, 24, 294-300). Dado que las enzimas PI3-quinasas de Clase I también participan en la motilidad y la migración (Sawyer, Expert Opinion Investig. Drugs, 2004, 13, 1-19), los inhibidores de PI3-quinasa deberían proporcionar beneficios terapéuticos a través de la inhibición de la invasión y metástasis de células tumorales.

Además, las enzimas PI3-quinasas de Clase I tienen una participación importante en la regulación de células inmunes con actividad de PI3-quinasa que contribuye con efectos pro-tumorigénicos de las células inflamatorias (Coussens y Werb, Nature, 2002, 420, 860-867). En efecto, la enzima PI3-quinasa de Clase Ia, PI3-quinasa  $\delta$ , está particularmente relacionada con la tumorigénesis en malignidades hematológicas, tales como leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y linfoma de células del manto (MCL). La señalización elevada de PI3K (principalmente p110 $\delta$ ) es reportada en un amplio rango de células linfoides malignas (Herman et al., Blood, 2010, 116, 2078; Ikeda et al., Blood, 2010, 116, 1460; Uddin et al., Blood, 2006, 108, 4178; Rudelius et al., Blood, 2006, 108, 1668; Garcia-Martinez, Br J Cancer, 2011, 104, 1116; Renne et al., Leukemia, 2007, 2, 780). Esto ha provocado el desarrollo de agentes que se dirigen a la PI3-quinasa  $\delta$ , con resultados clínicos iniciales prometedores en malignidades hematológicas (Castillo et al., Expert Opinion on Investigational Drugs, 2012, 21, 15).

Estos hallazgos sugieren que los inhibidores farmacológicos de las enzimas PI3-quinasas de Clase I deberían ser valiosos desde el punto de vista terapéutico para el tratamiento de distintas formas de cáncer que comprenden tumores sólidos tales como carcinomas y sarcomas y las leucemias y malignidades linfoides.

Estudios tempranos, tanto preclínicos como clínicos, que exploran los roles fisiológicos y patológicos de la enzima PI3-quinasa han utilizado en gran medida agentes con selectividad de inhibición de quinasa limitada, distribuidos en toda la familia de quinasas, en la familia de PI3-quinasas o en la familia de PI3-quinasas de Clase I. De esta forma, existe la necesidad de inhibidores farmacéuticos selectivos de PI3-quinasas de Clase I para proporcionar agentes terapéuticos útiles con el potencial de proporcionar un margen terapéutico mejorado con respecto a los agentes iniciales que ingresaron en la clínica.

5 Generalmente, los compuestos de la presente invención poseen actividad inhibitoria potente contra un subconjunto de enzimas PI3-quinasa de Clase I, particularmente contra las isoformas de PI3-quinasa- $\alpha$  y - $\delta$  de Clase Ia, con una moderación relativa de la isoforma - $\gamma$  y particularmente la - $\beta$ . Los compuestos también son selectivos contra una familia de PI3-quinasa más amplia y el quinoma más amplio. Dichos compuestos poseen una potencia suficiente contra las enzimas PI3-quinasa de Clase I y pueden utilizarse en una cantidad suficiente como para inhibir un subconjunto de isoformas de PI3-quinasa de Clase I, particularmente para inhibir las enzimas PI3-quinasa de Clase Ia - $\alpha$  y - $\delta$ , demostrando al mismo tiempo poca actividad contra otras quinazas.

10 La comprensión de la desregulación de la señalización de PI3-quinasa en cáncer humano y otras enfermedades ofrece la posibilidad de dirigirse a un subconjunto de pacientes que más probablemente se beneficiarán del tratamiento de los agentes descritos en esta patente, a través de un proceso conocido como Cuidado de salud personalizado (PHC) o Medicina personalizada. Para estos agentes, los pacientes cuya enfermedad depende de la señalización de PI3K- $\alpha$  y/o señalización de PI3K- $\delta$  elevada o alterada de otro modo pueden beneficiarse particularmente del tratamiento. Se sabe bien en la técnica que el diagnóstico puede utilizarse para proporcionar una lectura de biomarcadores de predicción de respuesta. Dicho diagnóstico podría medir una o más lecturas de la desregulación de las vías tales como, a modo no restrictivo, la mutación en los genes PIK3CA, PTEN o p85 (PIK3R), la amplificación y el número mayor de copias del gen PIK3CA, la sobreexpresión o actividad elevada de la isoforma PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  o el uso de una lectura de fosfobiomarcadores dentro de la vía, tal como fosfo-RTK o fosfo-AKT. Adicionalmente, la medición del estado de la mutación o el estado de la activación de genes adicionales, tales como Kras, un marcador potencial de la resistencia en los tumores con PIK3CA o PI3K- $\alpha$  aberrante o desregulado (Engelman et al., *Nature Medicine*, 2008 14, p1351-1355; Ihle et al., *Cancer Research*, 2009, 69, p143-160; Janku et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011, 10, p558 – 564), podría ayudar a aumentar la predictividad del abordaje de la Medicina personalizada. Alternativamente, en otro abordaje dirigido pero menos específico, el tratamiento podría centrarse en subconjuntos de la enfermedad donde se sabe que la desregulación de las isoformas de PI3K relevantes es más prevalente.

25 Los compuestos descritos podrían utilizarse para dirigirse a una enfermedad, ya sea solos o en combinación con un agente o agentes farmacéuticos. La combinación de los inhibidores de PI3-quinasa con otras terapias puede mejorar la eficacia superando los mecanismos de resistencia, ya sea innatos o inducidos en respuesta al agente de PI3-quinasa. Existen datos preclínicos importantes para respaldar dicho abordaje (Courtney et al, *J Clin Oncol*, 2010, 28, 1075; Engleman et al., *Nature Review Genetics*, 2006, 7, 607). Un abordaje consiste en combinaciones 'intra-vía' con agentes que modulan otros ejes de las vías de señalización de la PI3-quinasa (por ejemplo, mTOR, AKT, RTK, otro agente de PI3-quinasa). Un segundo abordaje consiste en combinaciones 'inter-vía', donde la inhibición de más de una vía de señalización puede ser beneficiosa con respecto a la inhibición de una sola vía (por ejemplo, combinado con inhibidores de MEK, inhibidores de Raf, moduladores de la familia Bcl, inhibidores de RTK o moduladores de la señalización del daño de ADN, tales como inhibidores de PARP). Otros abordajes incluyen aquellos donde el inhibidor de PI3-quinasa se combina con agentes o regímenes que ya están establecidos en la práctica clínica, denominados abordajes de Estándar de atención (SoC), o combinaciones con agentes que se dirigen a mecanismos de células no tumorales tales como células estromales tumorales o por medio del sistema inmunitario.

40 Además de tumorigénesis, existe evidencia de que las enzimas PI3-quinazas de Clase I desempeñan un papel en otras enfermedades (Wymann et al., *Trends in Pharmacological Science*, 2003, 24, 366-376). Tanto las enzimas PI3-quinazas de Clase Ia, en particular las PI3K- $\delta$ , como la enzima de Clase Ib (PI3K- $\gamma$ ) desempeñan importantes papeles en células del sistema inmune (Koyasu, *Nature Immunology*, 2003, 4, 313-319) y, por lo tanto, son objetivos terapéuticos para indicaciones inflamatorias y alérgicas. La inhibición de la PI3-quinasa es también, como se describe anteriormente, útil para tratar enfermedades cardiovasculares a través de efectos anti-inflamatorios o directamente mediante la afección de miocitos cardíacos (Prasad et al., *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2003, 13, 206-212). Por lo tanto, los inhibidores de las enzimas PI3-quinasa de Clase I pueden ser valiosos en la prevención y el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, además de cáncer.

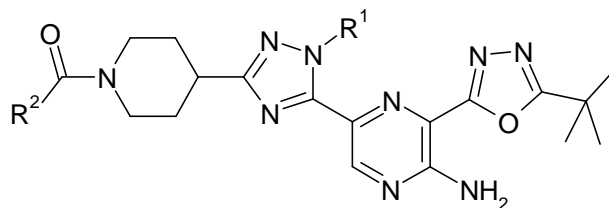
50 Se ha encontrado que los compuestos, es decir, los derivados de aminopirazina de la invención, poseen actividad anti-tumoral potente, siendo útiles para inhibir la proliferación celular no controlada que surge con la enfermedad maligna. Sin ánimo de que esto implique que los compuestos divulgados en la presente invención poseen actividad farmacológica sólo en virtud de un efecto en un proceso biológico, se cree que los compuestos proporcionan un efecto antitumoral a modo de inhibición de las enzimas PI3-quinasa de Clase I, particularmente a modo de inhibición de un subconjunto de las enzimas PI3-quinasa de Clase Ia, más particularmente a modo de inhibición de las isoformas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .

55 Los compuestos de la presente invención también pueden ser útiles para inhibir la proliferación celular no controlada que deriva de varias enfermedades no malignas, tales como enfermedad inflamatoria (por ejemplo, artritis reumatoide y enfermedad intestinal inflamatoria), enfermedades fibróticas (por ejemplo, cirrosis hepática y fibrosis pulmonar), glomerulonefritis, esclerosis múltiple, soriasis, hipertrofia prostática benigna (BPH), reacciones de hipersensibilidad de la piel, enfermedades de los vasos sanguíneos (por ejemplo aterosclerosis y restenosis), asma alérgico, diabetes dependiente de insulina, retinopatía diabética y nefropatía diabética.

60 Novartis ha divulgado amidas de prolina como agentes selectivos de PI3K- $\alpha$  en las Solicitudes de Patente Internacionales WO2009/080705, WO2010/029082 y WO2011/000905. La aminopirazina que contiene los inhibidores

de ATR quinasa se ha divulgado en los documentos WO2011/143426 y WO2010/071837 (Vertex).

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I)



(I)

5 en donde:

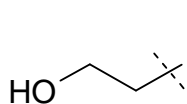
R<sup>1</sup> es metilo o etilo; y

R<sup>2</sup> es alquilo(C2-3) sustituido por hidroxilo;

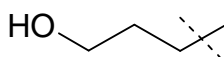
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente.

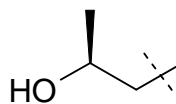
10 Se comprenderá que el término "alquilo(C2-3) sustituido por hidroxilo" incluye grupos alquilo de cadena recta y ramificada, por ejemplo los descritos como grupos (i) a (xi) a continuación:



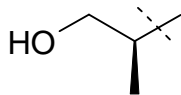
(i)



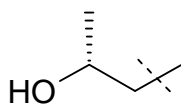
(ii)



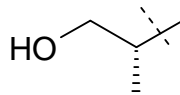
(iii)



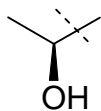
(iv)



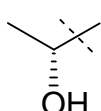
(v)



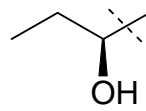
(vi)



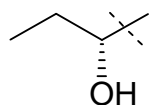
(vii)



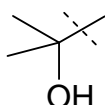
(viii)



(ix)



(x)



(xi)

Se comprenderá que, en la medida en que algunos de los compuestos de Fórmula (I) definidos anteriormente pueden existir en formas ópticamente activas o racémicas en virtud de uno o más átomos de carbono asimétricos, la invención

- incluye en su definición cualquier forma ópticamente activa o racémica que presente actividad inhibitoria de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ . La síntesis de formas ópticamente activas puede llevarse a cabo mediante técnicas estándar de química orgánica muy conocidas en la técnica, por ejemplo mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos o mediante resolución de una forma racémica. De manera similar, la actividad mencionada anteriormente puede evaluarse utilizando técnicas de laboratorio estándar.
- 5 Un enantiómero particular de un compuesto descrito en la presente puede ser más activo que otros enantiómeros del mismo compuesto.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es un enantiómero simple en un exceso enantiomérico (%ee) de  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$ . Convenientemente, el enantiómero simple está presente en un exceso enantiomérico (%ee) de  $\geq 99\%$ .
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), que es un enantiómero simple en un exceso enantiomérico (%ee) de  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  o  $\geq 99\%$  o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Convenientemente, el enantiómero simple está presente en un exceso enantiomérico (%ee) de  $\geq 99\%$ .
- 15 Algunos compuestos de Fórmula (I) pueden ser cristalinos y pueden tener más de una forma cristalina. Se comprenderá que la presente invención abarca toda forma cristalina o amorfa, o mezclas de las mismas, que posea propiedades útiles para la inhibición de la actividad de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ , y en la técnica se conoce bien cómo determinar la eficacia de una forma cristalina o amorfa para la inhibición de la actividad de PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  mediante las pruebas convencionales descritas más adelante en la presente.
- 20 Generalmente se sabe que los materiales cristalinos pueden analizarse utilizando técnicas convencionales tales como análisis por difracción de polvo de rayos X (en adelante XRPD), calorimetría de barrido diferencial (en adelante DSC), análisis termogravimétrico (en adelante TGA), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia difusa (DRIFT), espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) o espectroscopia de resonancia magnética nuclear en solución y/o estado sólido. El contenido de agua de dichos materiales cristalinos puede determinarse mediante análisis de Karl Fischer.
- 25 A modo de ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 exhibe cristalinidad y puede identificarse una forma cristalina.
- Por lo tanto, un aspecto adicional de la invención es la Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona.
- 30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 5.1°.
- 35 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 18.0°.
- 40 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.1 y 18.0°.
- 45 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.1, 18.0, 10.2, 11.7, 19.4, 18.5, 14.8, 26.7, 26.6, 17.8°.
- 50 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X básicamente igual al patrón de difracción de polvo de rayos X que se muestra en la Figura 1.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 5.1° más menos 0.2° 2-theta.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 18.0° más menos 0.2° 2-theta.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.1 y 18.0° más menos 0.2° 2-theta.

- 5 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.1, 18.0, 10.2, 11.7, 19.4, 18.5, 14.8, 26.7, 26.6, 17.8° más menos 0.2° 2-theta.

El Ejemplo 3 también es cristalino y se describen tres formas (A, B y C) en la presente.

- 10 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 4.8°.

- 15 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 10.0°.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente 2-theta = 4.8° y 10.0°.

- 20 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a aproximadamente 2-theta = 4.8, 10.0, 14.6, 5.2, 19.9, 10.4, 25.4, 23.6, 24.4, 16.2°.

- 25 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X básicamente igual al patrón de difracción de polvo de rayos X que se muestra en la Figura 3.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a 2-theta = 4.8° más menos 0.2° 2-theta.

- 30 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a 2-theta = 10.0° más menos 0.2° 2-theta.

- 35 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a 2-theta = 4.8° y 10.0° en donde dichos valores pueden ser más menos 0.2° 2-theta.

- 40 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a 2-theta = 4.8, 10.0, 14.6, 5.2, 19.9, 10.4, 25.4, 23.6, 24.4, 16.2° en donde dichos valores pueden ser más menos 0.2° 2-theta.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 5.8°.

- 45 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente 2-theta = 10.9°.

De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.8° y 10.9°.

- 50 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a aproximadamente 2-theta = 5.8, 10.9, 11.5, 25.9, 17.3, 24.0, 19.1, 12.9, 24.7, 27.2°.

- De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X básicamente igual al patrón de difracción de polvo de rayos X que se muestra en la Figura 5.
- 5 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 5.8^\circ$  más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 10.9^\circ$  más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- 10 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a  $2\text{-theta} = 5.8^\circ$  y  $10.9^\circ$  en donde dichos valores pueden ser más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- 15 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a  $2\text{-theta} = 5.8, 10.9, 11.5, 25.9, 17.3, 24.0, 19.1, 12.9, 24.7, 27.2^\circ$  en donde dichos valores pueden ser más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 6.9^\circ$ .
- 20 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a aproximadamente  $2\text{-theta} = 12.3^\circ$ .
- 25 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 6.9^\circ$  y  $12.3^\circ$ .
- De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 6.9, 12.3, 10.5, 21.0, 24.6, 13.6, 16.4, 19.6, 20.2, 22.5^\circ$ .
- 30 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X básicamente igual al patrón de difracción de polvo de rayos X que se muestra en la Figura 7.
- 35 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 6.9^\circ$  más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos un pico específico a  $2\text{-theta} = 12.3^\circ$  más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- 40 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a  $2\text{-theta} = 6.9^\circ$  y  $12.3^\circ$  en donde dichos valores pueden ser más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- 45 De acuerdo con la presente invención se proporciona una forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con picos específicos a  $2\text{-theta} = 6.9, 12.3, 10.5, 21.0, 24.6, 13.6, 16.4, 19.6, 20.2, 22.5^\circ$  en donde dichos valores pueden ser más menos  $0.2^\circ$   $2\text{-theta}$ .
- 50 Cuando se establece que la presente invención se refiere a una forma cristalina de un compuesto de la invención, tal como el Ejemplo 1 o Ejemplo 3, el grado de cristalinidad convenientemente es mayor que aproximadamente 60%, más convenientemente mayor que aproximadamente 80%, preferiblemente mayor que aproximadamente 90% y más preferiblemente mayor que aproximadamente 95%. Incluso más preferiblemente el grado de cristalinidad es mayor que aproximadamente 98%.



5 Cuando se establece que la presente invención se refiere a una forma cristalina de un compuesto de la invención, tal como el Ejemplo 1 o Ejemplo 3, la forma cristalina se encuentra preferiblemente básicamente libre de otras formas cristalinas o forma amorfa del mismo compuesto. En este contexto, "básicamente libre" convenientemente significa mayor que aproximadamente 60%, más convenientemente mayor que aproximadamente 80%, preferiblemente mayor que aproximadamente 90%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 95%, incluso más preferiblemente mayor que aproximadamente 98% y aun más preferiblemente mayor que aproximadamente 99% forma cristalina simple pura. Por ejemplo, el Ejemplo 3 pueden presentarse en forma de Forma A y básicamente libre de formas B y C; de forma alternativa, el Ejemplo 3 pueden presentarse en forma de Forma B y básicamente libre de formas A y C; de forma alternativa Ejemplo 3 pueden presentarse en forma de Forma C y básicamente libre de formas A y B. De forma similar, el Ejemplo 3 puede presentarse en forma de Forma B y básicamente libre de formas alternativas cristalinas o amorfas.

10 Se comprenderá que los valores de 2-theta de los patrones de difracción de polvo de rayos X pueden variar levemente de una máquina a otra o de una muestra a otra y, por lo tanto, los valores citados no deben considerarse como absolutos.

15 Se sabe que un patrón de difracción de polvo de rayos X puede obtenerse con uno o más errores de medición, dependiendo de las condiciones de medición (tal como el equipo o la máquina utilizados). En particular, es bien sabido que las intensidades en un patrón de difracción de polvo de rayos X pueden fluctuar, dependiendo de las condiciones de medición. Por lo tanto, debería comprenderse que las formas cristalinas de la presente invención descritas anteriormente, a menos que se indique de otra forma, no se limitan a los cristales que proporcionan patrones de difracción de polvo de rayos X idénticos a los patrones de difracción de polvo de rayos X que se muestran en las Figuras 1, 3, 5 y todo cristal que proporcione patrones de difracción de polvo de rayos X sustancialmente iguales a los que se muestran en estas Figuras se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Un experto en la técnica de la difracción de polvo de rayos X es capaz de juzgar la igualdad sustancial de los patrones de difracción de polvo de rayos X.

20 Las personas expertas en la técnica de difracción de polvo de rayos X también se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos puede verse afectada, por ejemplo, por granos por encima de los 30 micrones de tamaño y relaciones de aspecto no unitarias, los cuales pueden afectar el análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones puede verse afectada por la altura precisa a la que se encuentra la muestra en el difractómetro y la calibración de cero del difractómetro. La superficie plana de la muestra también puede influir de manera leve. Por lo tanto, los datos de los patrones de difracción presentados no deben tomarse como valores absolutos (Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, London; Klug, H. P. & Alexander, L. E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures).

25 En general, un error de medición en un ángulo de difracción en un difractograma de polvo de rayos X es de aproximadamente más menos 0.2° 2-theta, y tal grado de error de medición debería tomarse en cuenta al considerarse los datos de difracción de polvo de rayos X. Más aun, debe entenderse que las intensidades pueden fluctuar dependiendo de las condiciones experimentales y de la preparación de las muestras (orientación preferida).

30 Los compuestos particulares de la invención son cada uno de los Ejemplos, cada uno de los cuales proporciona un aspecto independiente adicional de la invención. Compuestos particulares adicionales de la invención son sales farmacéuticamente aceptables de cada uno de los Ejemplos, cada uno de los cuales proporciona un aspecto independiente adicional de la invención.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), que se puede obtener siguiendo cualquiera de los Ejemplos descritos en la presente.

Una característica adicional es cualquiera de los alcances definidos en la presente con la condición de que se renuncie individualmente a Ejemplos específicos tales como el Ejemplo 1, 3, 4, etc.

40 Los expertos en la técnica apreciarán que ciertos compuestos de Fórmula (I) contienen átomos de carbono asimétricamente sustituidos y, por lo tanto, pueden existir y aislarse en formas ópticamente activas y racémicas. Algunos compuestos de Fórmula (I) pueden exhibir polimorfismo. Debe entenderse que la presente invención abarca toda forma racémica, ópticamente activa, polimórfica o estereoisomérica, o mezclas de las mismas, que posea propiedades útiles para la inhibición de la actividad de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ . Es bien sabido en la técnica cómo preparar las formas ópticamente activas (por ejemplo, mediante resolución de la forma racémica mediante técnicas de recristalización, mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos, mediante síntesis quiral, mediante resolución enzimática, mediante biotransformación o mediante separación cromatográfica utilizando una fase estacionaria quiral) y cómo determinar la eficacia para la inhibición de la actividad de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  mediante las pruebas convencionales descritas más adelante en la presente.

45 Se comprenderá que ciertos compuestos de Fórmula (I) definidos anteriormente pueden exhibir el fenómeno de tautomerismo. Se comprenderá que la presente invención incluye en su definición cualquier forma tautomérica, o una mezcla de las mismas, que posee actividad inhibitoria de PI3K y no se limita a ninguna de las formas tautoméricas utilizadas en las figuras de las fórmulas o designadas en los Ejemplos. En general, solo se nombra una de dichas

formas tautoméricas en los ejemplos que figuran más adelante en la presente o en los dibujos de las fórmulas que figuran más adelante en la presente.

Se pretende que la presente invención incluya todos los isótopos de átomos que se encuentran en los presentes compuestos. Se comprenderá que los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. Por ejemplo, isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio. Los isótopos de carbono incluyen  $^{13}\text{C}$  y  $^{14}\text{C}$ .

Una sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal de adición de ácido de un compuesto de Fórmula (I), por ejemplo, una sal de adición de ácido con un ácido inorgánico u orgánico fuerte tal como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico o trifluoroacético. Otra sal farmacéuticamente aceptable adecuada de un compuesto de Fórmula (I) es, por ejemplo, una sal formada dentro del cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I).

Asimismo, se comprenderá que un solvato farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) también constituye un aspecto de la presente invención. Un solvato farmacéuticamente aceptable adecuado es, por ejemplo, un hidrato tal como un hemi-hidrato, un mono-hidrato, un di-hidrato o un tri-hidrato o una cantidad alternativa de los mismos.

Asimismo, se comprenderá que un profármaco farmacéuticamente aceptable adecuado de un compuesto de Fórmula (I) también constituye un aspecto de la presente invención. Por lo tanto, los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de un profármaco, es decir, un compuesto que se desintegra en el cuerpo humano o animal para liberar un compuesto de la invención. Un profármaco puede utilizarse para alterar las propiedades farmacocinéticas y/o las propiedades físicas de un compuesto de la invención. Un profármaco puede formarse cuando el compuesto de la invención contiene un grupo o sustituyente adecuado al que puede unirse un grupo modificador de las propiedades. Ejemplos de profármacos incluyen derivados de ésteres escindibles in vivo que pueden formarse en un grupo hidroxilo en un compuesto de Fórmula (I) y derivados de amida escindibles in vivo que pueden formarse en un grupo amino en un compuesto de Fórmula (I).

Por lo tanto, la presente invención incluye aquellos compuestos de la Fórmula (I), tal como se define anteriormente en la presente, cuando se obtienen mediante síntesis orgánica y cuando se obtienen en el cuerpo humano o animal mediante escisión de un profármaco de los mismos. Por lo tanto, la presente invención incluye aquellos compuestos de la Fórmula (I) que se producen por medios sintéticos orgánicos y también aquellos compuestos que se producen en el cuerpo humano o animal mediante el metabolismo de un compuesto precursor, es decir, un compuesto de Fórmula (I) puede ser un compuesto producido sintéticamente o un compuesto producido metabólicamente.

Un profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) es un profármaco que, según el criterio médico razonable, es adecuado para la administración al cuerpo humano o animal sin presentar actividades farmacológicas indeseables ni una toxicidad indebida.

Se han descrito varias formas de profármacos, por ejemplo, en los siguientes documentos:

- a) Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, editado por K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985);
- b) Design of Pro-drugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);
- c) A Textbook of Drug Design and Development, editado por Krogsgaard-Larsen y H. Bundgaard, Capítulo 5 "Design and Application of Pro-drugs", de H. Bundgaard p. 113-191 (1991);
- d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, **8**, 1-38 (1992);
- e) H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, **77**, 285 (1988);
- f) N. Kakeya, *et al.*, Chem. Pharm. Bull., **32**, 692 (1984);
- g) T. Higuchi y V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Volumen 14; y
- h) E. Roche (editor), "Bioreversible Carriers in Drug Design", Pergamon Press, 1987.

Un profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo es, por ejemplo, un éster o éter escindible in vivo del mismo. Un éster o éter escindible in vivo de un compuesto de Fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo es, por ejemplo, un éster o éter farmacéuticamente aceptable, que se escinde en el cuerpo humano o animal para producir el compuesto hidroxilo base. Los grupos formadores de éster farmacéuticamente aceptable adecuados para un grupo hidroxilo incluyen ésteres inorgánicos tales como ésteres de fosfato (incluyendo ésteres cíclicos fosforamídicos). Los grupos formadores de éster farmacéuticamente aceptable adecuados para un grupo hidroxilo incluyen grupos alcanilo(1-10C) tales como acetilo, benzoilo, grupos fenilacetilo y benzoilo y fenilacetilo sustituidos, grupos alcoxi(1-10C)carbonilo tales como grupos etoxicarbonilo, *N,N*-[di-(1-4C)alquilo]carbamoilo, 2-dialquilaminoacetilo y 2-carboxiacetilo. Ejemplos de sustituyentes en el anillo en los grupos fenilacetilo y benzoilo incluyen aminometilo, *N*-alquilaminometilo, *N,N*-dialquilaminometilo, morfolinometilo, piperazin-1-ilmetilo y 4-alquilo(1-

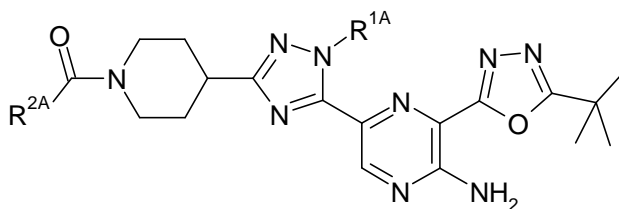
4C)piperazin-1-ilmetilo. Los grupos formadores de éter farmacéuticamente aceptables adecuados para un grupo hidroxilo incluyen grupos  $\alpha$ -aciloxialquilo tales como grupos acetoximetilo y pivaloiloximetilo

5 Un profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I) que tiene un grupo amino es, por ejemplo, un derivado de amida escindible in vivo del mismo. Las amidas farmacéuticamente aceptables adecuadas de un grupo amino incluyen, por ejemplo, una amida formada con grupos alcanilo(1-10C) tales como un acetilo, benzoilo, fenilacetilo y grupos benzoilo y fenilacetilo sustituidos. Ejemplos de sustituyentes en el anillo en los grupos fenilacetilo y benzoilo incluyen aminometilo, N-alquilaminometilo, N,N-dialquilaminometilo, morfolinometilo, piperazin-1-ilmetilo y 4-alquil(1-4C)piperazin-1-ilmetilo.

10 Los efectos in vivo de un compuesto de Fórmula (I) pueden producirse en parte por uno o más metabolitos que se forman en el cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I). Tal como se mencionó anteriormente en la presente, los efectos in vivo de un compuesto de Fórmula (I) también pueden producirse por el metabolismo de un compuesto precursor (un profármaco).

15 Los compuestos de Fórmula (I) contienen una sub-unidad de piperidina sustituida por  $-C(O)R^2$ , en donde  $R^2$  es alquilo(C2-3) sustituido por hidroxilo. Una ruta potencial de metabolismo de estos compuestos es mediante la oxidación del sustituyente hidroxilo en este grupo. Estos compuestos oxidados generalmente retienen algo de actividad inhibitoria de PI3K- $\alpha$  y  $-\delta$ .

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de la fórmula (A):



(A)

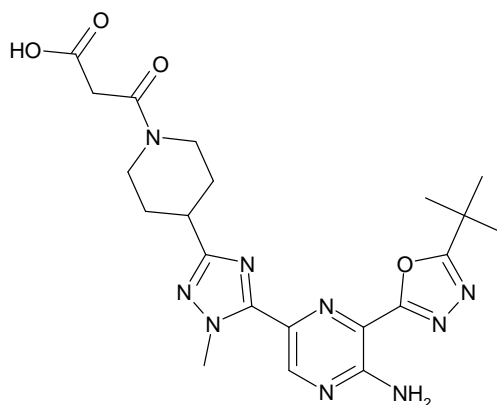
20 en donde:

$R^{1A}$  es metilo o etilo; y

$R^{2A}$  es alquilo(C1-2) sustituido por carboxi;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

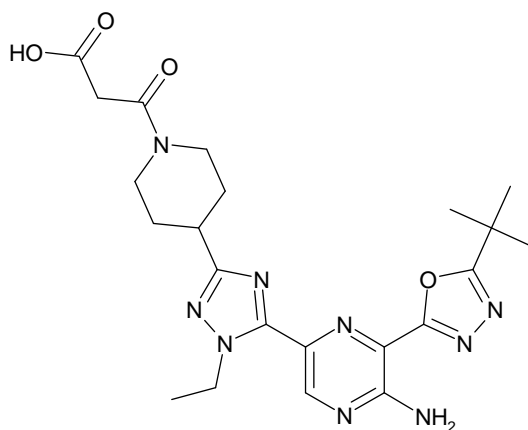
Ejemplos de compuestos de Fórmula (A) incluyen el Ejemplo 8, que es un metabolito identificado del Ejemplo 1.



Ejemplo 8

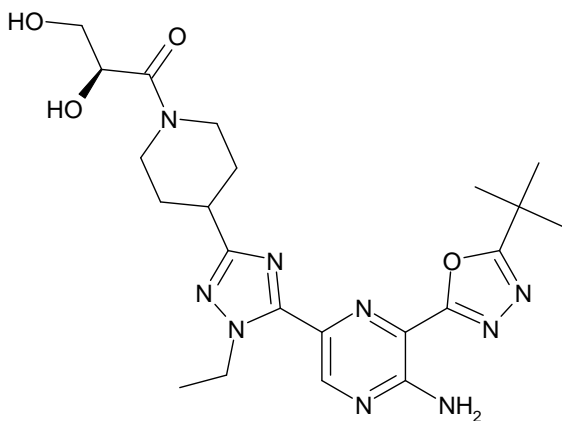
25

y el Ejemplo 9 que es un metabolito identificado del Ejemplo 3:

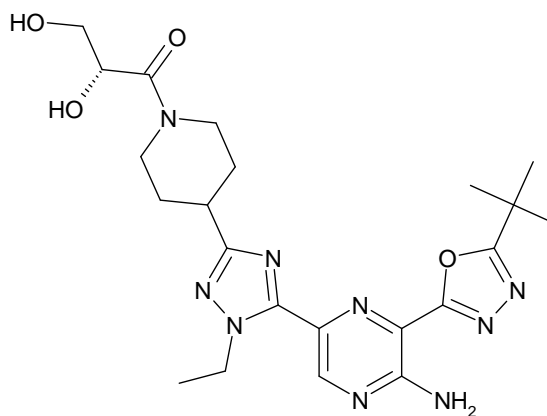


Ejemplo 9

Otros metabolitos potenciales del Ejemplo 3 son dos productos de oxidación alternativos que se muestran a continuación y se describen de forma adicional en los Ejemplos 10 y 11:



Ejemplo 10



Ejemplo 11

5

Sales adecuadas farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula (A) incluyen, por ejemplo, una sal de metal alcalino o alcalinotérreo tal como una sal de calcio o magnesio, o una sal de amonio, o una sal con una base orgánica tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina o tris-(2-hidroxietil)amina.

10 Con el fin de evitar dudas, se comprenderá que, en donde en esta memoria descriptiva, cuando un grupo es "tal como se define anteriormente" o "anteriormente definido", dicho grupo abarca la primera y más amplia definición, así como cada una de las definiciones particulares para ese grupo.

15 Novedosos compuestos de la invención particulares incluyen, por ejemplo, compuestos de Fórmula (I), o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en donde, a menos que se indique de otra forma, cada uno de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tiene cualquiera de los significados definidos anteriormente en la presente o en las siguientes afirmaciones:

R<sup>1</sup> es metilo.

R<sup>1</sup> es etilo.

R<sup>2</sup> es cualquiera de los grupos (i) a (xi) como se define anteriormente en la presente.

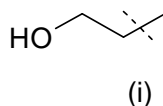
R<sup>2</sup> es los grupos (i) a (vi) como se define anteriormente en la presente.

20 R<sup>2</sup> es el grupo (i).

Un grupo particular de compuestos de la invención son compuestos de la Fórmula (I) precedente en donde:-

R<sup>1</sup> es metilo o etilo,

R<sup>2</sup> es el grupo (i):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Compuestos particulares de la invención son, por ejemplo, los compuestos de la fórmula (I) que se describen en los Ejemplos que figuran más adelante en la presente.

5 Por ejemplo, un compuesto particular de la invención es un compuesto de Fórmula (I) que se selecciona de cualquiera de los siguientes:-

1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona (Ejemplo 1 y 2);

10 1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona (Ejemplo 3);

(3R)-1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona (Ejemplo 4);

(3S)-1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona (Ejemplo 5);

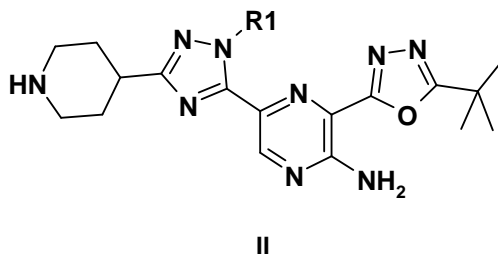
15 (2R)-1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-2-metil-propan-1-ona (Ejemplo 6);

1- [4- [5- [5-amino-6- (5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidroxi-2-metil-propan-1-ona (Ejemplo 7).

20 Otro aspecto de la presente invención proporciona un proceso para preparar un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Un proceso adecuado se ilustra mediante las siguientes variantes del proceso representativo en las que, a menos que se indique de otra forma, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> tienen cualquiera de los significados definidos anteriormente en la presente. Los materiales de partida necesarios pueden obtenerse mediante procedimientos de química orgánica convencionales. La preparación de dichos materiales de partida se describe junto con las siguientes variantes representativas del proceso y los ejemplos adjuntos. De forma alternativa, los materiales de partida necesarios se obtienen mediante procedimientos análogos a los ilustrados y que se encuentran dentro de la práctica común de un químico orgánico.

Variantes del proceso adecuadas incluyen, por ejemplo, las siguientes:

(a) la reacción, convenientemente en presencia de un reactivo de activación adecuado, de un compuesto de Fórmula II



30

en donde R<sup>1</sup> tiene uno de los significados definidos anteriormente en la presente, con el ácido carboxílico R<sup>2</sup>-COOH con la excepción de que cualquier grupo funcional se protege si es necesario, en presencia de una base adecuada, luego de lo cual se elimina cualquier grupo protector presente.

35 Agentes de acoplamiento adecuados para esta reacción incluyen por ejemplo, hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio, TBTU (2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio tetrafluoroborato) o 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato en presencia de N-óxido de 2-hidroxi-piridina.

La reacción convenientemente se lleva a cabo en presencia de una base adecuada. Una base adecuada es, por ejemplo, una base de amina orgánica tal como, por ejemplo, piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, diisopropil etil amina, o, por ejemplo, carbonato o hidróxido de metal alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio; preferiblemente N-etil-N,N-diisopropilamina.

40

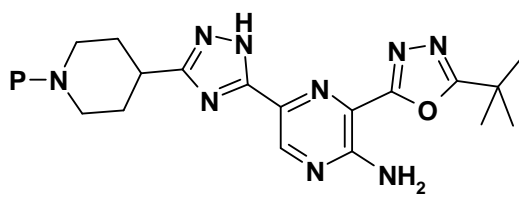
La reacción convenientemente se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte adecuado tal como por ejemplo, acetonitrilo, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno, metanol, etanol, disolventes halogenados tales como diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono y a una temperatura en el rango, por ejemplo, de  $-50^{\circ}\text{C}$  a  $100^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente en el rango de  $0^{\circ}\text{C}$  a  $30^{\circ}\text{C}$ .

- 5 De forma alternativa, el ácido carboxílico  $\text{R}^2\text{-COOH}$  puede transformarse en una especie activada, que luego puede hacerse reaccionar con un compuesto de Fórmula II en condiciones conocidas en la técnica.

Un grupo adecuado protector para el grupo hidroxilo es el grupo protector tetrahidropirano, como se describe en el Ejemplo 2 y 3.

- 10 Condiciones adecuadas para eliminar este grupo incluyen condiciones ácidas suaves en presencia de un alcohol como el disolvente a temperatura entre 20 a  $70^{\circ}\text{C}$ , tal como metanol o etanol. Un ácido suave típico que se utiliza es piridina *p*-toluenosulfonato.

Un compuesto de Fórmula II puede obtenerse a partir de la reacción de un compuesto de Fórmula III:



III

- 15 en donde P es un grupo protector, tal como terc-butoxicarbonilo,

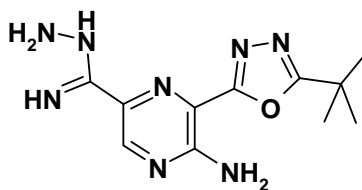
con un compuesto de Fórmula  $\text{R}^1\text{-L}$  cuando L es un grupo adecuado saliente tal como por ejemplo, un grupo halógeno tal como un grupo bromo, yodo (convenientemente yodo), en presencia de una base adecuada, luego de lo cual se elimina cualquier grupo protector presente.

Una base adecuada es, por ejemplo, una base de amina orgánica, tal como 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.

- 20 La reacción convenientemente se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte adecuado tal como, por ejemplo, 2-metiltetrahidrofurano, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno y a una temperatura en el rango, por ejemplo, de  $-50^{\circ}\text{C}$  a  $60^{\circ}\text{C}$ , preferiblemente en el rango de  $-10^{\circ}\text{C}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ .

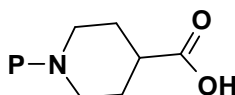
Condiciones adecuadas para la desprotección del terc-butoxicarbonilo incluyen condiciones ácidas tal como ácido trifluoroacético en un disolvente inerte tal como diclorometano a aproximadamente temperatura ambiente ( $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ ).

- 25 El Compuesto III puede obtenerse a partir de una reacción de acoplamiento en presencia de un reactivo de activación adecuado, del compuesto de Fórmula IV



IV

con un compuesto de Fórmula V



V

preferiblemente en presencia de una base adecuada, con posterior reacción de ciclización en presencia de un ácido suave.

- 35 La reacción de acoplamiento puede llevarse a cabo en presencia de un agente de acoplamiento adecuado tal como, por ejemplo, hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio o TBTU (2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-

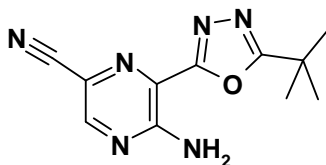
1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio tetrafluoroborato).

La reacción de acoplamiento convenientemente se lleva a cabo en presencia de una base adecuada. Una base adecuada es, por ejemplo, una base de amina orgánica tal como, por ejemplo, piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, *N*-metilmorfolina, diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, diisopropiletil amina, o, por ejemplo, un carbonato de metal alcalino o alcalinotérreo, por ejemplo carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio; preferiblemente *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina.

La reacción de acoplamiento convenientemente se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte adecuado tal como por ejemplo, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno, metanol, etanol, disolventes halogenados tal como diclorometano, cloroformo o tetracloruro de carbono y a una temperatura en el rango, por ejemplo, de -50°C a 100°C, preferiblemente en el rango de 0°C a 30°C.

Las condiciones de ciclización se llevan a cabo en presencia de un ácido suave, típicamente ácido acético. La reacción convenientemente se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte adecuado tal como por ejemplo, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno a una temperatura en el rango, por ejemplo, de 50°C a 150°C, preferiblemente en el rango de 80°C a 100°C.

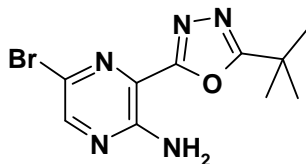
El Compuesto IV puede obtenerse a partir de la reacción de un compuesto de Fórmula VI con hidrazina.



VI

Esta reacción convenientemente se lleva a cabo en presencia de un disolvente inerte adecuado tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno o un alcohol tal como etanol o isopropanol a una temperatura en el rango, por ejemplo, de 20°C a 70°C, preferiblemente cerca de 50°C.

El Compuesto VI puede obtenerse a partir de una reacción catalizada por metal de un compuesto de Fórmula VII con una fuente de cianuro tal como dicianuro de zinc (II).



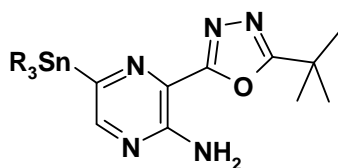
VII

Un catalizador adecuado para la reacción incluye, por ejemplo, un catalizador metálico tal como paladio(0), por ejemplo tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0); o un catalizador formado in situ a partir de una sal de paladio (II), por ejemplo acetato de paladio(II), cloruro de paladio(II), bromuro de paladio(II), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II), [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), o tris(dibencilidenoacetona)dipaladio y un ligando de fosfina, por ejemplo, dicitclohexil(2',4',6'-triisopropilbifenil-2-il)fosfina. La reacción convenientemente se lleva a cabo en un disolvente adecuado tal como, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno o xileno y a una temperatura en el rango, por ejemplo, de 20°C a 150°C, preferiblemente en el rango de 60°C a 120°C. La reacción convenientemente también se lleva a cabo en presencia de metal de adición, tal como zinc.

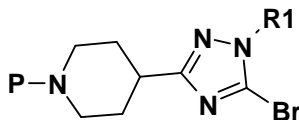
Reacciones adecuadas de este tipo se describen en 'Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions', Segunda edición, editado por Armin Meijere, François Diederich, Wiley-VCH, 2004).

Las síntesis del Compuesto VII se han descrito en los Ejemplos 1 y 2.

De forma alternativa, un compuesto de Fórmula II puede obtenerse mediante reacción catalizada por metal del compuesto VIII, en donde R es un alquilo pequeño y compuesto IX, en donde P es un grupo protector, tal como terc-butoxicarbonilo,



VIII



IX

- 5 Un catalizador adecuado para la reacción incluye, por ejemplo, un catalizador metálico tal como paladio(0), por ejemplo tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0); o un catalizador formado in situ a partir de una sal de paladio (II), por ejemplo acetato de paladio(II), cloruro de paladio(II), bromuro de paladio(II), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II), [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), o tris(dibencilidenoacetona)dipaladio y un ligando de fosfina, por ejemplo, dicitclohexil(2',4',6'-trisisopropilbifenil-2-il)fosfina.
- 10 La reacción convenientemente se lleva a cabo en un disolvente adecuado tal como, *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno o xileno o un alcohol tal como 4-metil-2-pentanol a una temperatura en el rango, por ejemplo, de 50°C a 180°C, preferiblemente en el rango de 120°C a 150°C.

La reacción convenientemente también se lleva a cabo en presencia de más sal tal como cloruro de litio.

- 15 Reacciones adecuadas de este tipo se describen en 'Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions', Segunda edición, editado por Armin Meijere, François Diederich, Wiley-VCH, 2004).
- 20 Un compuesto de Fórmula VIII puede obtenerse a partir de una reacción catalizada por metal del compuesto VII con un hexa-alkil diestano adecuado. Un catalizador adecuado para la reacción incluye, por ejemplo, un catalizador metálico tal como paladio(0), por ejemplo tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0); o un catalizador formado in situ a partir de una sal de paladio (II), por ejemplo acetato de paladio(II), cloruro de paladio(II), bromuro de paladio(II), cloruro de bis(trifenilfosfina)paladio(II), [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II), o tris(dibencilidenoacetona)dipaladio y un ligando de fosfina, por ejemplo, dicitclohexil(2',4',6'-trisisopropilbifenil-2-il)fosfina.

- 25 La reacción convenientemente se lleva a cabo en un disolvente adecuado tal como *N,N*-dimetilacetamida, *N,N*-dimetilformamida, tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benceno, tolueno, xileno o un alcohol tal como 4-metil-2-pentanol a una temperatura en el rango, por ejemplo, de 50°C a 100°C, preferiblemente en el rango de 70°C a 80°C.

El Compuesto de Fórmula IX puede obtenerse a partir de material comercialmente disponible en pocos pasos, tal como se ilustra en el Ejemplo 1 (con R<sup>1</sup>= Me y P= terc-butoxicarbonilo).

- 30 Se comprenderá que otras permutaciones de los pasos del proceso en las diferencias del proceso descritas anteriormente son también posibles.

Se comprenderá que cualquier compuesto de Fórmula (I) obtenido mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente en la presente pueden convertirse en otro compuesto de Fórmula (I) si es necesario.

- 35 Cuando se necesita una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I), por ejemplo una sal de adición de ácido, la misma puede obtenerse mediante, por ejemplo, reacción de dicho compuesto con un ácido adecuado.

- 40 Cuando se necesita un profármaco farmacéuticamente aceptable de un compuesto de Fórmula (I), el mismo pueden obtenerse utilizando un procedimiento convencional. Por ejemplo, un éster escindible in vivo de un compuesto de Fórmula (I) puede obtenerse mediante, por ejemplo, reacción de un compuesto de Fórmula (I) que contiene un grupo hidroxilo con un ácido carboxílico farmacéuticamente aceptable. Información adicional acerca de profármacos ha sido proporcionada anteriormente en la presente.

También se apreciará que en algunas de las reacciones mencionadas anteriormente en la presente puede ser necesario o deseable proteger los grupos sensibles en los compuestos. Los expertos en la técnica conocen los casos en los cuales la protección es necesaria o deseable y métodos adecuados para dicha protección. Los grupos protectores convencionales pueden utilizarse de acuerdo con la práctica convencional (para mayor información ver T.W. Green,



Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 1991). De esta forma, si los reactivos incluyen grupos tales como amino, carboxi o hidroxil, será deseable proteger el grupo en algunas de las reacciones mencionadas en la presente.

5 Un grupo protector adecuado para un grupo amino o alquilamino es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo un grupo alcanoilo tal como acetilo, un grupo alcoxycarbonilo, por ejemplo un grupo metoxycarbonilo, etoxycarbonilo o *t*-butoxycarbonilo, un grupo arilmetoxycarbonilo, por ejemplo benciloxycarbonilo o un grupo aroilo, por ejemplo benzoilo. Las condiciones de desprotección para los grupos protectores mencionados anteriormente necesariamente variarán con la elección del grupo protector. De esta forma, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanoilo o alcoxycarbonilo o un grupo aroilo puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o sodio. De manera alternativa, un grupo acilo tal como un grupo *t*-butoxycarbonilo puede retirarse, por ejemplo, mediante tratamiento con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico o ácido trifluoroacético y un grupo arilmetoxycarbonilo tal como un grupo benciloxycarbonilo puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación en un catalizador tal como paladio sobre carbono o mediante tratamiento con un ácido de Lewis, por ejemplo tris(trifluoroacetato) de boro. Un grupo protector alternativo adecuado para un grupo amino primario es, por ejemplo, un grupo ftaloilo que puede retirarse mediante tratamiento con una alquilamina, por ejemplo dimetilaminopropilamina o con hidrazina.

20 Un grupo protector adecuado para un grupo hidroxil es, por ejemplo, un grupo acilo, por ejemplo un grupo alcanoilo tal como acetilo, un grupo aroilo, por ejemplo benzoilo, o un grupo arilmetilo, por ejemplo bencilo. Las condiciones de desprotección para los grupos protectores mencionados anteriormente necesariamente variarán con la elección del grupo protector. De esta forma, por ejemplo, un grupo acilo tal como un grupo alcanoilo o un grupo aroilo, puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base adecuada tal como un hidróxido de metal alcalino, por ejemplo hidróxido de litio o sodio. De manera alternativa un grupo arilmetilo tal como un grupo bencilo puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación en un catalizador tal como paladio sobre carbono.

25 Un grupo protector adecuado para un grupo carboxil es, por ejemplo, un grupo esterificador, por ejemplo, un grupo metilo o etilo que puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrólisis con una base tal como hidróxido de sodio, o por ejemplo un grupo *t*-butilo que puede retirarse, por ejemplo, mediante tratamiento con un ácido, por ejemplo un ácido orgánico tal como ácido trifluoroacético o por ejemplo un grupo bencilo que puede retirarse, por ejemplo, mediante hidrogenación en un catalizador tal como paladio sobre carbono.

30 Los grupos protectores pueden retirarse en cualquier etapa conveniente en la síntesis utilizando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica química.

Algunos de los intermediarios (por ejemplo, compuestos de las fórmulas II, III, IV, VI, VII, VIII) definidos en la presente son novedosos y se proporcionan como una característica adicional de la invención.

#### Ensayos biológicos

35 Los siguientes ensayos se utilizaron para medir los efectos de los compuestos de la presente invención como a) inhibidores de las enzimas PI3-quinasa en ensayos bioquímicos, b) como inhibidores de otras quinasa en ensayos bioquímicos, c) como inhibidores in vitro de fosfo AKT (Thr308) en células BT474, d) como inhibidores in vitro de fosfo AKT (Ser473) en células MDA-MB-468, e) como inhibidores in vitro de fosfo AKT (Ser473) en células JEKO, f) como inhibidores in vitro de fosfo Chk1 (Ser345) en células HT29, g) como inhibidores de proliferación celular en un panel de líneas celulares tumorales, h e i) como inhibidores in vivo de fosfo AKT (Ser473) o inhibidores in vivo del crecimiento tumoral, respectivamente, en ratones SCID trasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MCF7.

Abreviaturas utilizadas en los Protocolos de ensayo:

PIP2:	PI(4,5)P2, fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
s.c.:	subcutáneamente
45 ATP:	Adenosina trifosfato
DMSO:	Dimetilsulfóxido
TRIS:	Tris(Hidroximetil)aminometano
CHAPS:	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
DTT:	Ditiotreitól
50 FBS:	Suero bovino fetal
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco

	EDTA:	Ácido etilendiaminatetraacético
	EGTA:	Ácido etilenglicol tetraacético
	BSA:	Albúmina de suero bovino
	PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
5	HRP:	Peroxidasa de rábano picante
	RPMI:	Medio de Roswell Park Memorial Institute 1640
	4NQO:	4-Nitroquinolina N-óxido
	EMEM:	Medio esencial mínimo de Eagle
	CO <sub>2</sub> :	Dióxido de carbono
10	PBST:	Solución salina tamponada con fosfato / Tween
	Ab:	Anticuerpo
	Reactivo de MTS:	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina) PMS.

(a) Ensayo de inhibición de enzimas in vitro

- 15 La inhibición de PI3K- $\beta$ , PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$  y PI3K- $\delta$  fue evaluada en un ensayo de actividad enzimática basado en Kinase Glo que utilizó enzimas recombinantes humanas. La plataforma del ensayo midió indirectamente el agotamiento de ATP después de la incubación con enzima, sustrato de PIP<sub>2</sub>, ATP y compuesto.

Después de completarse la reacción enzimática, el ATP restante se utilizó en una reacción enzimática secundaria, donde la luciferasa convirtió la luciferina de escarabajo en oxiluciferina bajo la emisión de luz. Existió una relación directa entre la luminiscencia medida y el ATP restante en una reacción de quinasa completada. Por lo tanto, la luminiscencia estuvo inversamente relacionada con la actividad de la quinasa. Típicamente, se evaluaron doce concentraciones de compuesto diferentes y los datos sin procesar de la inhibición de PI3K- $\beta$ , PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$  o PI3K- $\delta$  se graficaron con respecto a la concentración de inhibidor.

*Detalles del método:*

- 25 Se agregaron compuestos en 100% de DMSO a placas de ensayo por dispensación acústica.

La enzima PI3K se agregó en una solución amortiguadora de Tris (50mM de Tris pH7.4, 0.05% de CHAPS, 2.1mM de DTT y 10mM de cloruro de magnesio) y se dejó preincubar con el compuesto durante 20 minutos antes de la adición de la solución del sustrato que contenía PIP<sub>2</sub> y ATP. La reacción enzimática se detuvo después de 80 minutos por la adición de la solución de detección Kinase Glo que contenía luciferina y luciferasa (del kit de ensayo de quinasa luminiscente Kinase Glo(R) Plus (Promega No. V3772). Las placas se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente y luego se leyeron sobre un instrumento Pherastar con un bloqueo de filtro de luminiscencia estándar. La concentración final de DMSO, ATP y PIP<sub>2</sub> en el ensayo fue de 1%, 8 $\mu$ M y 80 $\mu$ M, respectivamente.

*Análisis de los datos*

- 35 Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon usando un ajuste de curva logarítmica a un ajuste de regresión no lineal. El valor de CI<sub>50</sub> fue la concentración de compuesto de prueba que inhibió el 50% de la actividad enzimática.

(b) Evaluación de la selectividad de la quinasa, más allá de las enzimas P13-quinasa de clase 1

- 40 Muchos proveedores comerciales ofrecen grandes paneles de ensayos de quinasa, tales como Millipore, Invitrogen y ProQinase. Dichos paneles permiten una evaluación de la selectividad general de la quinasa de un compuesto dado. Los métodos / tecnologías precisos variarán dependiendo del proveedor.

Los datos de selectividad para algunos de los compuestos descritos en la presente se generaron usando ensayos enzimáticos realizados en la MRC - División de Terapia de Transducción de Señales (DSTT), Unidad de Fosforilación de Proteínas de MRC, Dundee, Reino Unido. Los ensayos de proteína quinasa se realizaron usando un formato radioquímico. Los ensayos se realizaron en placas de 384 pocillos Multidrop a temperatura ambiente en un volumen de ensayo total de 25.5 $\mu$ l. Los compuestos fueron preincubados en presencia de la enzima y el sustrato de péptido/proteína durante 5 minutos antes de iniciarse la reacción por adición de 10  $\mu$ l de ATP (concentración final seleccionada para cada quinasa a 5, 20 o 50  $\mu$ M). Los ensayos se pasaron a temperatura ambiente antes de la

5 finalización por la adición de 5µl de ácido ortofosfórico. El contenido de la placa de ensayo se cosechó luego sobre Placas Whatman-P81-Unifilter en una Cosechadora Packard (la solución amortiguadora de lavado fue 50mM de ácido ortofosfórico) y se secó con aire. Las placas Unifilter secas se sellaron luego con la adición de MicroScint O y se contaron en contadores de centelleo Packard Topcount NXT. Este protocolo captura el formato genético adecuado para la mayoría de las quinasas en el panel, pero fueron necesarias modificaciones en los protocolos para un pequeño número de quinasas, como será evidente para los expertos en la técnica.

10 Los ensayos de quinasa lipídica para ~18 quinasas lipídicas se realizaron también en DSTT. Todos los ensayos de quinasa lipídica se llevaron a cabo en placas de 384 pocillos a temperatura ambiente en un volumen total de ensayo de 40µl. El ensayo se realizó de acuerdo con los protocolos proporcionados por el ensayo ADP-GLO (Promega, No. V9101). Este protocolo captura el formato genético adecuado para la mayoría de las quinasas en el panel, pero fueron necesarias modificaciones en los protocolos para un pequeño número de quinasas, como será evidente para los expertos en la técnica.

15 La selectividad de quinasa también se evaluó usando la plataforma de detección KINOMEScan™ disponible por DiscoverX. Esta emplea un ensayo de unión de competición dirigido al sitio para medir cuantitativamente las interacciones entre los compuestos de prueba y más de 450 quinasas humanas y las variantes mutantes relevantes de la enfermedad. Los ensayos KINOMEScan™ no requieren ATP y, por lo tanto, reportan verdaderas afinidades de interacción termodinámica, en oposición a los valores de CI50, que pueden depender de la concentración de ATP. La metodología se basa en los compuestos que se unen al sitio activo de quinasa y que previenen directamente (estéricamente) o indirectamente (alostéricamente) la unión de quinasa al ligando inmovilizado, reduciendo así la cantidad de quinasa capturada en un soporte sólido. Por el contrario, las moléculas de prueba que no se unen a la quinasa no tienen efecto en la cantidad de quinasa capturada sobre un soporte sólido. Los "aciertos" de detección son identificados midiendo la cantidad de quinasa capturada en la prueba con respecto a las muestras testigo usando un método de qPCR que detecta la etiqueta de ADN asociada. De manera similar, las constantes de disociación (Kds) para las interacciones entre el compuesto de prueba-quinasa se calculan midiendo la cantidad de quinasa capturada sobre el soporte sólido en función de la concentración del compuesto de prueba.

25 (c) Protocolo para ensayo que mide la AKT fosforilada (Tyr308) en células BT474

Este ensayo se utilizó para medir la inhibición de PI3K-α en las células. Las células BT474 (carcinoma ductal de mama humano, ATCC HTB-20) se sembraron en placas negras de 384 pocillos (Costar, No. 3712) a una densidad de 5600 células / pocillo en DMEM que contenía 10% de FBS y 1% de glutamina y se dejaron adherir toda la noche.

30 A la mañana siguiente, se agregaron los compuestos en 100% de DMSO a placas de ensayo por dispensación acústica. Después de 2 horas de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio fue aspirado y las células se lisaron con una solución amortiguadora que contenía 25mM de Tris, 3mM de EDTA, 3mM de EGTA, 50mM de fluoruro de sodio, 2mM de ortovanadato de sodio, 0.27M de sacarosa, 10mM de β-glicerofosfato, 5mM de pirofosfato de sodio, 0.5% de Triton X-100 y comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche No. 04 693 116 001, se usó 1 comprimido por 50ml de solución amortiguadora de lisis).

35 Después de 20 minutos, los lisados celulares se transfirieron a placas ELISA (Greiner No. 781077) que habían sido pre-recubiertas con un anticuerpo anti-AKT en solución amortiguadora de PBS y se bloqueó la unión no específica con 1% de BSA en PBS que contenía 0.05% de Tween 20. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las placas se lavaron con solución amortiguadora de PBS que contenía 0.05% de Tween 20 y se incubaron adicionalmente con un anti-fosfo AKT T308 monoclonal de ratón durante 2 horas. Las placas se volvieron a lavar como anteriormente antes de la adición de un anticuerpo secundario conjugado de HRP anti-ratón de caballo. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron y se agregó a cada pocillo una solución de trabajo de sustrato de QuantaBlu (Thermo Scientific No. 15169, preparada de acuerdo con las instrucciones del proveedor). El producto fluorescente desarrollado se detuvo después de 60 minutos con la adición de solución de cese a los pocillos. Las placas se leyeron usando una lectora de placas Tecan Safire usando longitudes de onda de excitación de 325 nm y de emisión de 420 nm, respectivamente. Salvo en caso que se especifique, los reactivos contenidos en el kit ELISA tipo sándwich Path Scan Phospho AKT (Thr308) de Cell Signalling (No. 7144) se utilizaron en este ensayo ELISA.

40 (d) Protocolo para la detección de fosfo AKT (Ser473) en células MDA-MB-468 como una medición para la inhibición de PI3-quinasa-beta.

45 Este ensayo se utilizó para medir la inhibición de PI3K-β en las células, y se utilizó, junto con el ensayo (c) anterior, para determinar la selectividad alfa con respecto a beta en las células. Se sembraron células MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama humano No. ATCC HTB 132) a razón de 1500 células / pocillo en 40µl de DMEM que contenía 10% de FBS y 1% de glutamina en placas Greiner de 384 pocillos de fondo plano negro. Las placas celulares se incubaron durante 18 horas en una incubadora a 37°C antes de la dosificación con compuestos en 100% de DMSO usando dispensación acústica.

55 Los compuestos fueron dosificados en un rango de concentración de 12 puntos en un mapa de placas aleatorizado. Se generaron pocillos testigo mediante dosificación con 100% de DMSO (señal máxima) o adición de un compuesto de referencia (inhibidor de PI3K-β) que eliminó completamente la señal de pAKT (testigo mínimo). Las placas se incubaron

a 37°C durante 2 horas, las células se fijaron por la adición de 10µl de una solución de formaldehído al 3.7%. Después de 30 minutos, las placas se lavaron con PBS usando una lavadora de placas Tecan PW384. Los pocillos se bloquearon y las células se permeabilizaron con la adición de 40µl de PBS que contenía 0.5% de Tween 20 y 1% de Marvel™ (leche en polvo seca) y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS que contenía 0.5% (v/v) de Tween 20 y se agregaron 20µl de Ser473 anti-fosfo AKT de conejo (Cell Signalling Technologies, No. 3787) en el mismo PBS-Tween + 1% Marvel™ y se incubaron toda la noche a 4°C.

Las placas se lavaron 3 veces con PBS + 0.05% de Tween 20 usando un Tecan PW384. Se agregaron 20µl de anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-conejo (Molecular Probes, No. A11008) diluido en PBS + 0.05% de Tween 20 que contenía 1% de Marvel™ a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces como anteriormente, luego se agregaron 20µl de PBS a cada pocillo y las placas se llevaron con un sellador de placas negro.

Las placas se leyeron en una lectora de placas Acumen tan pronto como fue posible, midiendo la fluorescencia verde después de la excitación con láser a 488nm. Usando este sistema, se generaron los valores de  $CI_{50}$  y se determinó la calidad de las placas por los pocillos testigo. Los compuestos de referencia se pasaron cada vez para monitorear el rendimiento del ensayo.

(e) Protocolo para la detección de fosfo AKT (ser473) en células Jeko

Este ensayo se utilizó para medir la inhibición de PI3K-δ en células. Se agregaron compuestos a una concentración final x10 en 10µl de 1% (v/v) de DMSO a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo en V Greiner (Sigma No. M9686). Los compuestos se dosificaron en un rango de concentración de 10 puntos de una dosis máxima de 1µM o 10µM, se dosificaron 8 compuestos en una placa. Hubo 8 pocillos testigo con señal máxima dosificados con anti-IgM (anti-IgM humana de cabra de fragmento F(ab')<sub>2</sub> AffiniPure (Stratech, No. 109-006-129)) y vehículo, y 8 pocillos testigo con señal mínima dosificados con anti-IgM y un inhibidor PI3K-δ de referencia. La concentración de vehículo final fue 0.1% de DMSO. Una curva de respuesta a la dosis completa para un compuesto selectivo de PI3K-δ se incluyó en cada pasada. Se sembraron células Jeko B (linfoma de células del manto humano, ATCC No. CRL-3006) en las placas de 96 pocillos de fondo en V Greiner que contenían los compuestos. Las células se sembraron a razón de 100,000 células/pocillo en 70µl de RPMI que contenía 1% de glutamina.

Las placas de células se incubaron con un compuesto durante 1 hora en una incubadora a 37°C. Después de este tiempo de pre-incubación de compuesto, el anti-IgM descrito anteriormente se agregó a las placas a una concentración final x5 en 20µl de solución amortiguadora de ensayo (RPMI que contenía 1% de glutamina). La concentración anti-IgM final fue 0.06µg/ml o una dosis de EC90 equivalente. Las placas se incubaron a 37°C durante 10min, luego las placas se colocaron inmediatamente sobre hielo y se centrifugaron a 12000rpm durante 4min. Se quitaron cuidadosamente los sobrenadantes sobre hielo con una pipeta manual y se agregaron 40µl de solución amortiguadora de lisis. Las placas se incubaron sobre hielo durante 5min y se almacenaron a -80°C hasta ensayarse en el kit de lisado de fósforo (Ser473)/células enteras de Akt totales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mesoscale Diagnostics, No. K11100D-3).

(f) Protocolo para la detección de fosfo Chk1 (Ser 345) en células HT29

La ATR (quinasa relacionada con la Ataxia Telangiectasia + Rad3) es una quinasa relacionada con la PI3-quinasa que fosforila múltiples sustratos sobre residuos de serina o treonina en respuesta al daño del ADN o bloques de replicación. La Chk1, una proteína quinasa corriente abajo de ATR, juega un papel fundamental en el control del punto de control del daño de ADN. La activación de la Chk1 implica la fosforilación de Ser317 y Ser345 (esta última es considerada el objetivo preferencial para fosforilación / activación por ATR).

Este fue un ensayo basado en células para medir la inhibición de la ATR quinasa mediante la medición de una reducción de la fosforilación de Chk1 (Ser 345) en células HT29 después del tratamiento con compuesto y 4NQO mimético UV (Sigma No. N8141). Se sembraron células HT29 (ECACC No. 85061109) en placas de ensayo de 384 pocillos (Costar No. 3712) a una densidad de 6000 células / pocillo en 40µl de un medio de EMEM que contenía 1% de L glutamina y 10% de FBS y se dejaron adherir toda la noche. A la mañana siguiente se agregaron los compuestos en 100% de DMSO a placas de ensayo por dispensación acústica. Después de 1 hora de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se agregaron 40nl de 3mM de 4NQO en 100% de DMSO a todos los pocillos por dispensación acústica, excepto los pocillos testigo mínimos que se dejaron sin tratar con 4NQO para generar un testigo carente de respuesta. Las placas se volvieron a colocar en la incubadora durante 1 hora más. Luego se fijaron las células agregando 20µl de 3.7% de formaldehído en solución de PBS e incubando durante 20 mins a temperatura ambiente. Luego se agregaron 20µl de 0.1% de Triton X100 en PBS y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para permeabilizar las células. Luego se lavaron las placas una vez con 50µl / pocillo de PBS usando una lavadora de placas Biotek EL405.

El anticuerpo Ser345 de fosfo-Chk1 (Cell Signalling Technology No. 2348) se diluyó 150 veces en PBS que contenía 0.05% de polisorbato/Tween y se agregaron 15µl a cada pocillo y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente las placas se lavaron tres veces con 50µl / pocillo de PBS, usando una lavadora de placas Biotek EL405 y luego se agregaron 20µl de solución de Ab secundario, que contenía IgG anti-conejo de cabra Alexa Fluor 488 diluida 500 veces (Molecular Probes No. A-11008) y 0.002mg/ml de tinte Hoeschst (Molecular Probes

No. H-3570) en PBST. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con 50µl / pocillo de PBS usando una lavadora de placas Biotek EL405 y luego se sellaron las placas con sellos de placa negros hasta que se leyeron. Las placas se leyeron usando un instrumento ArrayScan VTI usando un filtro XF53 con un objetivo 10X. Un montaje de dos láseres se utilizó para analizar la tinción nuclear con Hoeschst (405nm) y una tinción de anticuerpos secundarios de pChk1 (488nm).

(g) Ensayos de proliferación celular en líneas celulares tumorales (utilizadas para demostrar una hipótesis de medicina personalizada)

La sensibilidad de un panel de líneas celulares de cáncer humano a los efectos de los compuestos se determinó en un ensayo de proliferación estándar. Las líneas celulares fueron proporcionadas por el Banco de Células de AstraZeneca. La mayoría de las líneas celulares también están disponibles en los Depósitos del Banco de Células conocidos por quienes trabajan en la técnica, por ejemplo, ATCC, ECACC, DMSZ, RIKEN, KCLB, JCRB (HSRRB), LBNL, CLS e ICLC.

Se colocaron células en placas de 96 pocillos a densidades de 1000-6000 células por pocillo en medios de RPMI que contenían 10% de FBS. Después de la incubación a 37°C durante 16 horas, se agregaron varias concentraciones de compuesto a las placas de ensayo. Después de la incubación durante 72h adicionales se determinaron las células viables por la adición de un reactivo de MTS (Promega No. 3582) a cada pocillo durante 2h. MTS es una sal de tetrazolio que es biorreducida por células metabólicamente activas en presencia de un reactivo de acoplamiento de electrones a formazán. El producto de formazán se cuantificó luego por absorbancia a 490 nm como un indicador del número relativo de células vivas. Con el fin de determinar la GI50 (concentración en la que el crecimiento de las células se inhibió un 50%), se determinó el número relativo de células presentes en el momento de adición de los fármacos por comparación con la lectura de MTS antes de que se agregara el fármaco, y este valor se restó del valor a las 72 hr de células sin tratar como una medida del crecimiento celular durante el ensayo.

El análisis de estos datos, descrito más adelante con el título 'Ejemplos de Cuidado de salud personalizado / Medicina personalizada' ilustra cómo pueden analizarse estos datos para revelar que los inhibidores de PI3Kα exhiben una inhibición del crecimiento selectiva de las líneas celulares con la mutación del gen PIK3CA. Esto ilustra una oportunidad de Cuidado de salud personalizado (PHC) o Medicina personalizada donde una lectura del biomarcador de predicción de respuesta podría utilizarse para identificar pacientes con tumores que contienen la mutación en el gen PIK3CA y que sería más probable que respondieran a los compuestos descritos en la presente.

Otros marcadores potenciales de respuesta a los compuestos descritos en la presente incluyen, a modo no taxativo, número más alto de copias, amplificación o translocación del gen PIK3CA y otros cambios genéticos, genómicos o proteómicos que proporcionan una medida de la activación o dependencia de la vía de PI33-quinasa; por ejemplo, a modo no taxativo, activación de una o más tirosina quinasa receptoras, o mutación o translocación en los genes PIK3R que codifican las subunidades reguladoras (p85) de PI3-quinasa, o fosforilación de marcadores de señalización corriente abajo tales como pAKT, pS6, o estado de FOXO. Adicionalmente, el análisis de genes adicionales y/o la señalización de sus productos de proteína, por ejemplo, Kras, puede ayudar a mejorar la predictividad de un abordaje de Medicina personalizada.

(h) Protocolo para la detección de fosfo AKT (ser473) de tumores MCF-7 cultivados en ratones SCID macho

Este fue un ensayo farmacodinámico que proporcionó una medida de la inhibición de PI3K-α en un modelo animal. Se trasplantaron ratones SCID macho (AZ UK, también disponibles en Charles River, Reino Unido) por vía subcutánea (s.c.) con línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (ICRF London, también disponible en ATCC No. HTB-22)) para determinar la inhibición de la fosforilación de AKT con inhibidores de PI3-quinasa. Los ratones fueron implantados con 0.5mg de gránulos de estrógenos de 21 días (Innovative Research of America, No. E121) 24 horas antes del implante de células. 5X 10<sup>6</sup> células en 50% de matrigel (BD Bioscience) se inyectaron s.c. en la ijada izquierda de los animales. Los animales fueron aleatorizados en grupos testigo de 8 y de tratamiento de 4 cuando los tumores alcanzaron un volumen de 400mm<sup>3</sup> y la dosificación comenzó al día siguiente. Los tumores se extrajeron en los puntos de tiempo seleccionados, cuando las muestras de sangre también se extrajeron para las mediciones de PK.

Los tumores extirpados de ratón se colocaron en un tubo Fast Prep (tubos de 2ml acanalados que contenían matriz A de lisado, MP Biomedicals No. 6910-500) y se enfriaron inmediatamente. Se agregó a cada tubo 1ml de solución amortiguadora de lisis (25mM de Tris, 3mM de EDTA, 3mM de EGTA, 50mM de fluoruro de sodio, 2mM de ortovanadato, 0.27M de sacarosa, 10mM de beta-glicerofosfato, 5mM de pirofosfato, 0.5% de Triton x-100) más inhibidores de fosfatasa (Sigma No. P2850 y Sigma No. P5726, dilución 1:100) e inhibidores de proteasa (Sigma No. P8340, dilución 1:200). Los tumores fueron homogenizados durante 1 minuto sobre una máquina FastPrep-TM (MP Biomedicals No. 116004500) y luego se dejaron sobre hielo durante 5 minutos, seguido de dos etapas de homogenización adicional, cada una seguida de incubación sobre hielo durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm en una centrifugadora enfriada. Los lisados aclarados se trasladaron a tubos nuevos y se utilizaron 10µl para un ensayo de determinación de proteínas.

La detección de AKT total y fosforilada (ser473) se llevó a cabo usando un kit de ensayo de múltiples puntos de MSD (Meso Scale Discovery No. K1510OD-3). Cada pocillo de la placa contenía 4 puntos; dos de éstos se recubrieron con anticuerpos monoclonales de ratón proporcionados con el kit; uno se recubrió con un anticuerpo de captura para AKT

total y uno se recubrió con un anticuerpo para AKT fosforilada (ser473). Las placas se bloquearon durante la noche en la habitación fría sobre un agitador con 150µl de solución de bloqueo por pocillo, que se realizó usando 20ml de solución 1x de solución de lavado más 600mg de Bloqueador A suministrado con el kit. Las placas se lavaron tres veces con 0.3ml por pocillo de solución de lavado. Una alícuota del lisado se retiró de cada tumor y se diluyó hasta una concentración de 2mg/ml con solución amortiguadora de lisis, luego se agregaron 25µl del lisado diluido a cada pocillo proporcionando una cantidad total de 50µg por pocillo. Las placas se colocaron sobre un agitador a temperatura ambiente durante una hora antes de que las placas se lavaran tres veces. Se preparó una solución de anticuerpo de detección usando una mezcla de solución de bloqueo y lavado más una dilución 1 en 50 del anticuerpo anti AKT total 50x SULFO-TAG –TM. Las placas se colocaron sobre un agitador a temperatura ambiente durante una hora antes de que las placas se lavaran tres veces. 150µl de solución amortiguadora de lectura suministrada con el kit se diluyó 1:4 con agua desionizada y se agregó a cada pocillo y luego la placa se leyó sobre un analizador de placas de MSD. La solución amortiguadora de lectura da el ambiente químico correcto para electroquimioluminiscencia, de forma tal que cuando la lectora de placa aplica un voltaje a la placa los electrodos sobre la base de la placa hacen que la etiqueta unida al anticuerpo de detección emita luz. La intensidad de luz emitida es una medida cuantitativa de la AKT, ya sea total o fosforilada, que está presente. Para calcular la relación entre la AKT fosforilada y total se aplicó un cálculo según lo sugerido por Meso Scale: señal dos veces fosforilada dividida entre una señal total más fosforilada luego multiplicada por 100 para proporcionar el % de fosfoproteína. Los valores se convirtieron a Log 10 y después estos valores se utilizaron para calcular la Media geométrica para cada grupo más error estándar. Se aplicó luego una prueba T student usando una fórmula de 2 colas y una varianza desigual para verificar la significancia. Los estudios mostraron que un grupo testigo de 8 animales con 4 por grupo de tratamiento fue suficiente para realizar el estudio.

(i) Protocolo para la detección de la inhibición del crecimiento tumoral en línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 trasplantado en ratones SCID.

Este método proporciona la evaluación de la eficacia antitumoral de inhibidores de PI3-quinasa in vivo en un modelo dependiente de PI3K- $\alpha$ . Con respecto a los estudios de PD indicados anteriormente, los ratones SCID macho fueron trasplantados s.c. con línea celular de adenocarcinoma de mama humano, MCF7. Los ratones fueron implantados con 0.5mg de gránulos de estrógenos de 21 días 24 horas antes del implante de células.  $5 \times 10^6$  células en 50% de matrigel se inyectaron s.c. en la jada izquierda de los animales. Los animales fueron aleatorizados en grupos de 10-15 cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~200-300mm<sup>3</sup> y comenzó el tratamiento. Los animales fueron dosificados durante 2-4 semanas por vía peroral, intravenosa o intraperitoneal con un compuesto en un vehículo adecuado para dosificación por la vía requerida y consiste con los requisitos de bienestar (suspensión para la dosificación oral en un rango de pH 4-7, solución para dosificación ip/iv en un rango de pH de 5.5-7.0) y en las dosis definidas. Los tumores fueron normalmente medidos dos veces por semana por calibre y el volumen de los tumores se calculó usando una fórmula elíptica ( $\pi/6 \times \text{ancho} \times \text{ancho} \times \text{largo}$ ).

Si bien las propiedades farmacológicas de los compuestos de Fórmula (I) varían, como se esperaba, con el cambio estructural, en general la actividad que poseen los compuestos de Fórmula (I) puede demostrarse en las siguientes concentraciones o dosis en una o más de las pruebas (a) a (c) precedentes:

Prueba (a):-  $Cl_{50}$  con respecto a PI3K- $\alpha$  en el rango, por ejemplo, de 1nM - 100 nM;

Prueba (c):  $Cl_{50}$  con respecto a fosfo AKT celular (Tyr308) en células BT474, en el rango, por ejemplo, de 10nM - 1 µM;

De manera conveniente, compuestos particulares de la invención poseen actividad en las siguientes concentraciones o dosis en una o más de las pruebas (a) y (c) precedentes:

Prueba (a):-  $Cl_{50}$  con respecto a PI3K- $\alpha$  en el rango, por ejemplo, de 1nM - 100 nM;

Prueba (c):  $Cl_{50}$  con respecto a fosfo AKT celular (Tyr308) en células BT474, en el rango, por ejemplo, de 10nM - 1 µM;

De manera conveniente, compuestos particulares de la invención poseen actividad en las siguientes concentraciones o dosis en una o más de las pruebas (a), (c), (h) e (i) precedentes:-

Prueba (a):-  $Cl_{50}$  con respecto a PI3K- $\alpha$  en el rango, por ejemplo, de 1nM - 100 nM;

Prueba (c):  $Cl_{50}$  con respecto a fosfo AKT celular (Tyr308) en células BT474, en el rango, por ejemplo, de 10nM - 1 µM;

Prueba (h):- >50% de inhibición de fosfo AKT in vivo (ser473) en el rango de, por ejemplo, 1-200 mg/kg/día;

Prueba (i):- actividad de xenoinjerto en el rango de, por ejemplo, 1-200 mg/kg/día.

Los siguientes datos fueron generados para los Ejemplos:

**Tabla A:**

Número de ejemplo	Cl <sub>50</sub> de inhibición de PI3K-α (μM)*	Cl <sub>50</sub> de inhibición de PI3K-δ (μM)*	Cl <sub>50</sub> de inhibición de PI3K-β (μM)*	Cl <sub>50</sub> de célula PI3K-α (μM)**	Cl <sub>50</sub> de célula ATR (μM)#
1	0.023	<0.014	2.24	0.36	>30
3	0.007	<0.010	0.57	0.09	>30
4	0.025	<0.012	2.91	0.31	>30
5	0.030	0.012	3.31	0.27	>30
6	0.032	<0.012	3.42	0.53	>30
7	0.037	0.014	6.26	0.42	>30
8	0.024	0.012	1.52	0.59	>30
9	<0.010	<0.010	0.640	0.33	-
10	-	-	-	0.085	-
11	-	-	-	0.11	-

\* Protocolo de prueba a: estos son valores medios calculados a partir de una serie de repeticiones de la prueba.

\*\* Protocolo de prueba c: estos son valores medios calculados a partir de una serie de repeticiones de la prueba.

# Protocolo de prueba f: sólo se llevó a cabo una repetición de la prueba.

## 5 Estudios de combinación

### Materiales y métodos

10 MCF7 es una línea celular de tumor de mama positivo para el receptor de estrógenos que tiene una mutación en el gen PIK3CA (E545K). Los ratones SCID macho (AZ UK) fueron trasplantados por vía subcutánea (s.c.) con línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (ICRF London) para determinar la actividad antitumoral de los inhibidores de PI3 quinasa. Los ratones fueron implantados con 0.5mg de gránulos de estrógenos de 21 días (Innovative Research of America) 24 horas antes del implante de células. 5X 10<sup>6</sup> células en 50% de matrigel (BD Bioscience) se inyectaron s.c. en la ijada izquierda de los animales.

15 BT474 es una línea celular de tumor de mama positivo para el receptor de estrógenos con expresión de Her2 elevada y tiene una mutación en el gen PIK3CA (K111N). Ratones desnudos atímicos suizos hembra (nu/nu suizos - AZUK) fueron trasplantados por vía subcutánea con línea celular de carcinoma ductal de mama epitelial humano BT474c (derivada de AZ de BT474 - ATCC HTB-20) tumores pasados en los ratones. Los ratones fueron implantados con 0.36mg de gránulos de estrógenos de 60 días (Innovative Research of America) 24 horas antes del implante de células. 5X 10<sup>6</sup> células en 50% de matrigel (BD Bioscience) se inyectaron s.c. en la ijada izquierda de los animales.

HCC70 es una línea celular de tumor de mama con expresión del gen PTEN deficiente.

20 Ratones desnudos atímicos suizos hembra (nu/nu suizos - AZUK) fueron trasplantados subcutáneamente con células de la línea celular de tumor epitelial ductal de mama HCC70 (ATCC – CRL2315). 1X 10<sup>6</sup> células en 50% de matrigel (BD Bioscience) se inyectaron s.c. en la ijada izquierda de los animales.

25 Los animales fueron aleatorizados en grupos de 10-15 cuando los tumores alcanzaron un volumen de ~200-300mm<sup>3</sup> y comenzó el tratamiento. Los animales fueron dosificados durante 3-4 semanas por vía peroral con un compuesto en un vehículo adecuado a dosis y horarios definidos. Los tumores se midieron dos a tres veces por semana por calibre y volumen de los tumores calculado usando una fórmula elíptica (pi/6 x ancho x ancho x largo).

Cuando se dosificó solo, el AZD5363 se formuló en 10% de DMSO, 25% de solución de Kleptose. (Kleptose es suministrada por Roquette-Pharma (Marca registrada) betaciclodextrina de hidroxipropilo - adecuada para uso y

formulaciones in vivo).

Cuando se co-dosificó con el Ejemplo 3, AZD5363 se formuló en HPMC/Tween (0.5% de Methocel (metocelulosa de hidroxipropilo) / 0.1% de Polisorbato 80). La suspensión se trituró usando un molino de bolas durante la noche.

El Ejemplo 3 se formuló en HPMC/Tween (0.5% de Methocel (metocelulosa de hidroxipropilo) / 0.1% de Polisorbato 80).

5 AZD8186 se formuló en HPMC/Tween (0.5% de Methocel (metocelulosa de hidroxipropilo) / 0.1% de Polisorbato 80).

Cuando se co-dosificó con el Ejemplo 3, AZD8186 se formó en HPMC/Tween (0.5% de Methocel (metocelulosa de hidroxipropilo) / 0.1% de Polisorbato 80). La suspensión se trituró usando un molino de bolas durante la noche.

El olaparib se formuló en 10% de DMSO/30% de solución de Kleptose.

10 **Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con inhibidor de AKT (AZD5363) - administración secuencial**

15 Se realizaron estudios en el modelo de xenoinjerto de BT474. El Ejemplo 3 y AZD5363 se dosificaron dos veces al día (BID) con intervalos de 6 – 8 horas en un ciclo semanal de 2 días con administración / 5 días sin administración en secuencia de forma tal que AZD5363 se dosificó los días 1 y 2 del ciclo semanal y el Ejemplo 3 se dosificó los días 3 y 4 del ciclo semanal. El Ejemplo 3 se dosificó a 50mg/kg BID y AZD5363 se dosificó a 170mg/kg BID, en HPMC/Tween y DMSO/Kleptose respectivamente.

La curva de crecimiento tumoral (que se muestra en la Figura 9) indica que la dosificación intermitente del Ejemplo 3 o AZD5363 inhibió parcialmente el crecimiento tumoral con respecto al testigo de solo vehículo (HPMC/Tween). La combinación del Ejemplo 3 más AZD5363 indujo la regresión tumoral.

20 **Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con inhibidor de AKT (AZD5363) - co-administración**

Se realizaron estudios en el modelo de xenoinjerto de BT474. El Ejemplo 3 y AZD5363 se dosificaron dos veces al día (BID) con un intervalo de 6 – 8 horas y concomitantemente en un ciclo semanal de 2 días con administración / 5 días sin administración. El Ejemplo 3 se dosificó a 25mg/kg BID y AZD5363 se dosificó a 100mg/kg BID, tanto en HPMC/Tween.

25 La curva de crecimiento tumoral (que se muestra en la Figura 10) indica que la dosificación intermitente del Ejemplo 3 o AZD5363 inhibió parcialmente el crecimiento tumoral con respecto al testigo de solo vehículo (HPMC/Tween). La combinación del Ejemplo 3 más AZD5363 indujo la regresión tumoral durante el período de dosificación, a pesar de que posteriormente hubo un recrecimiento tumoral durante el período libre de dosificación.

**Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con inhibidor de PARP (Olaparib)**

30 Se realizaron estudios en el modelo de xenoinjerto de BT474. El Ejemplo 3 y Olaparib se dosificaron cada día a lo largo del estudio: el Ejemplo 3 dos veces por día (BID) con un intervalo de 6-8 horas a 25mg/kg cada dosis y Olaparib una vez al día (QD) a 100mg/kg 1 hora después de la primera dosis diaria del Ejemplo 3. Ambos agentes se dosificaron en HPMC/Tween.

35 La curva de crecimiento tumoral (Figura 11) indica que el Olaparib solo no tuvo un efecto importante en el crecimiento tumoral, el Ejemplo 3 solo inhibió parcialmente el crecimiento, pero la combinación del Ejemplo 3 más Olaparib indujo la regresión tumoral.

**Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PARP (Olaparib)**

40 Se realizaron estudios en el modelo de xenoinjerto de MCF7. El Ejemplo 3 y Olaparib se dosificaron cada día a lo largo del estudio: el Ejemplo 3 dos veces por día con un intervalo de 6-8 horas a 25mg/kg cada dosis y Olaparib una vez al día (QD) a 100mg/kg 1 hora después de la primera dosis diaria del Ejemplo 3. Ambos agentes se dosificaron en HPMC/Tween.

La curva de crecimiento tumoral (Figura 12) indica que el Olaparib solo tuvo un efecto mínimo en el crecimiento tumoral, el Ejemplo 3 solo provocó poca regresión tumoral, pero la combinación del Ejemplo 3 más Olaparib indujo una mayor regresión tumoral.

45 **Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PI3Kbeta/delta (AZD8186)**

Se realizaron estudios en el modelo de xenoinjerto de HCC70. El Ejemplo 3 y AZD8186 se dosificaron todos los días, dos veces al día (BID), a lo largo del estudio: el Ejemplo 3 a 25 mg/kg cada dosis y AZD8186 a 50 mg/kg cada dosis. Ambos agentes se dosificaron en HPMC/Tween.

50 La curva de crecimiento tumoral (Figura 13) indica que AZD8186 inhibió parcialmente el crecimiento tumoral, el Ejemplo 3 solo inhibió el crecimiento en mayor medida, pero la combinación del Ejemplo 3 más AZD8186 indujo la regresión



tumoral.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se definió anteriormente en la presente en asociación con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para una formulación en comprimidos incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes de granulación y desintegración, agentes de unión, agentes lubricantes, agentes conservantes y antioxidantes. Las formulaciones en comprimidos pueden estar sin recubrir o recubiertas para modificar su desintegración y posterior absorción del ingrediente activo en el tracto gastrointestinal o para mejorar su estabilidad y/o apariencia y, en cualquier caso, utilizando agentes de recubrimiento convencionales y procedimientos conocidos en la técnica.

10 Las composiciones para uso oral pueden presentarse alternativamente en forma de cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con agua o un aceite.

15 Las suspensiones acuosas generalmente contienen el ingrediente activo en forma de polvo fino junto con uno o más agentes de suspensión, agentes dispersantes o humectantes. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, antioxidantes, agentes colorantes, agentes saborizantes y/o agentes edulcorantes.

20 Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal o en un aceite mineral. Las suspensiones oleosas también pueden contener un agente espesante. Los agentes edulcorantes como los mencionados anteriormente y los agentes saborizantes pueden agregarse para proporcionar una preparación oral agradable al paladar. Estas composiciones pueden conservarse agregando un antioxidante.

Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante el agregado de agua contienen, generalmente, el ingrediente activo junto con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. También pueden estar presentes excipientes adicionales como agentes edulcorantes, saborizantes y colorantes.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o una mezcla de cualquiera de éstos. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, saborizantes y conservantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, y también pueden contener un agente demulcente, conservante, saborizante y/o colorante.

30 Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de una suspensión oleosa o acuosa inyectable estéril que puede formularse de acuerdo con los procedimientos conocidos utilizando uno o más de los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados mencionados anteriormente. Una preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteral aceptable no tóxico.

35 Las composiciones para la administración por inhalación pueden estar en forma de un aerosol presurizado convencional diseñado para dispensar el ingrediente activo como un aerosol que contiene gotitas líquidas o sólidas finamente divididas. Se pueden utilizar propelentes para aerosoles convencionales como hidrocarburos fluorados o hidrocarburos volátiles y el dispositivo de aerosol puede diseñarse convenientemente para dispensar una cantidad cuantificada del ingrediente activo.

40 Para obtener más información sobre la formulación, se remite al lector al capítulo 25.2 del volumen 5 de Comprehensive Medicinal Chemistry (Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board), Pergamon Press 1990.

45 La cantidad de ingrediente activo que se combina con uno o más excipientes para producir una forma de dosificación única variará necesariamente según el huésped tratado y la vía de administración particular. Por ejemplo, la administración oral a humanos generalmente requerirá, por ejemplo, de 1 mg a 2 g de agente activo (más adecuadamente de 100 mg a 2 g, por ejemplo de 250 mg a 1.8 g, tal como de 500 mg a 1.8 g, particularmente de 500 mg a 1.5 g, de manera conveniente de 500 mg a 1 g) para administrar en compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de excipientes que puede variar de aproximadamente 3 a aproximadamente 98 por ciento en peso de la composición total. Se comprenderá que, si se requiere una dosis más alta, pueden requerirse formas de dosificación múltiple, por ejemplo, dos o más comprimidos o cápsulas, con la dosis de ingrediente activo dividida de forma conveniente entre ellos. De manera conveniente, una forma de dosificación sólida única puede contener entre 1 y 300 mg de ingrediente activo.

50 El tamaño de la dosis con fines terapéuticos o profilácticos de un compuesto de Fórmula (I) naturalmente variará de acuerdo con la naturaleza y gravedad del estado de la enfermedad, la edad y el sexo del animal o paciente y la vía de administración, de acuerdo con principios bien conocidos en la medicina.

- 5 Cuando se utiliza un compuesto de la Fórmula (I) con fines terapéuticos o profilácticos generalmente se administrará en una dosis diaria de entre, por ejemplo, 1 mg/kg a 100 mg/kg por kilo de peso corporal, la cual podrá administrarse en dosis divididas si es necesario. En general se administrarán dosis más bajas cuando se emplee una vía parenteral. Así, por ejemplo, para la administración intravenosa se utilizará generalmente una dosis entre por ejemplo, 1 mg/kg a 25 mg/kg por kilo de peso corporal. En forma similar, para la administración por inhalación, se utilizará una dosis de entre, por ejemplo, 1 mg/kg a 25 mg/kg por kilo de peso corporal. Sin embargo, se prefiere la administración oral, en particular en forma de comprimido. Típicamente, las formas de dosificación unitarias contendrán aproximadamente 10 mg a 0,5 g de un compuesto de esta invención.
- 10 Los compuestos de la invención se pueden administrar diariamente o más de una vez al día. Los compuestos de la invención también se pueden administrar en un esquema de dosificación adecuado, por ejemplo, los compuestos de la invención se pueden administrar una o más veces al día (por ejemplo, una, dos o tres veces al día) durante un número determinado de días, seguidos por un período de días en el que no se administra ninguna dosis. A continuación, se puede repetir este ciclo de dosificación (constituido por días de dosificación y días sin dosificación). Convenientemente, un ciclo de dosificación es un período de 5-14 días, tal como 5, 7, 10 o 14 días, más convenientemente 7 días. En un aspecto, los compuestos de fórmula (I) se dosifican durante 1 día o 2 o 3 días consecutivos, seguidos por 3, 4, 5 o 6 días sin dosis en un ciclo de dosificación.
- 15 En un aspecto, el compuesto de fórmula (I) se dosifica durante 1 día seguido por ninguna dosis durante 2, 3 o 4 días.
- En otro aspecto, el compuesto de fórmula (I) se dosifica durante 2 días seguidos por ninguna dosis durante 4, 5 o 6 días.
- 20 En un aspecto adicional, el compuesto de fórmula (I) se dosifica durante 3 días seguidos por ninguna dosis durante 3, 4 o 5 días.
- En otro aspecto, el compuesto de fórmula (I) se dosifica durante 4 días seguidos por ninguna dosis durante 2, 3 o 4 días.
- 25 En otro aspecto, el compuesto de fórmula (I) se dosifica durante 5 días seguidos por ninguna dosis durante 1, 2 o 3 días.
- En otro aspecto, el compuesto de fórmula (I) se dosifica un día sí y un día no.
- Los esquemas de dosificación anteriores se aplican convenientemente cuando los compuestos de la invención se utilizan como monoterapia. En lo sucesivo en la presente se describen más ejemplos de posibles esquemas de dosificación para la administración de los compuestos de la invención como terapia de combinación.
- 30 Tal como se indicó anteriormente, se sabe que las enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  contribuyen a la tumorigénesis por medio de uno o más de los efectos de mediación de la proliferación del cáncer y otras células, mediando los eventos angiogénicos y mediando la motilidad, migración e invasividad de las células cancerosas. Hemos encontrado que los compuestos de la presente invención poseen una actividad antitumoral potente que se cree que se obtiene mediante la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  que participan en las etapas de transducción de señales que provocan la proliferación y supervivencia de las células tumorales y la invasividad y capacidad migratoria de las células tumorales metastásicas.
- 35 Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son de valor como agentes antitumorales, en particular como inhibidores selectivos de la proliferación, supervivencia, motilidad, diseminación e invasividad de las células de cáncer de mamífero que provocan la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia y para inhibición del crecimiento tumoral metastásico. Particularmente, los compuestos de la presente invención son de valor como agentes anti-proliferativos y anti-invasivos en la contención y/o el tratamiento de enfermedades de tumor sólido. Particularmente, se espera que los compuestos de la presente invención sean útiles en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  y que participan en las etapas de transducción de señales que producen la proliferación y supervivencia de células tumorales y la capacidad migratoria e invasividad de las células tumorales metastásicas. Asimismo, se espera que los compuestos de la presente invención sean útiles en la prevención o el tratamiento de los tumores que son mediados solo o en parte por la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$ , es decir, los compuestos pueden utilizarse para producir un efecto inhibidor de la enzima PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  en un animal de sangre caliente que necesita dicho tratamiento.
- 40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso como un medicamento en un animal de sangre caliente tal como el hombre.
- 45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso en la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como el hombre.
- 55 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso en un

animal de sangre caliente tal como el hombre como un agente antiinvasivo en la contención y/o tratamiento de una enfermedad de tumor sólido.

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en la producción de un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

10 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en un animal de sangre caliente tal como el hombre como un agente antiinvasivo en la contención y/o tratamiento de una enfermedad de tumor sólido.

15 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para producir un efecto antiproliferativo en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

20 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para producir un efecto anti-invasivo mediante la contención y/o tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

30 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para la prevención o el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente tal como el hombre.

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad de tumor sólido en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  que participan en los pasos de transducción de señales que conducen a la capacidad de proliferación, supervivencia, invasividad y migración de células tumorales.

50 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  que participan en los pasos de transducción de señales que conducen a la capacidad de proliferación, supervivencia, invasividad y migración de células tumorales.

- 5 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para la prevención o el tratamiento de los tumores que son sensibles a la inhibición de las enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$  que participan en los pasos de transducción de señales que conducen a la capacidad de proliferación, supervivencia, invasividad y migración de células tumorales que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso para proporcionar un efecto inhibitorio de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .
- 10 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso para proporcionar un efecto inhibitorio de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención también se proporciona un método para proporcionar un efecto inhibitorio de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.
- 15 Como se indicó anteriormente en la presente, ciertos compuestos de la presente invención poseen una potencia sustancialmente mejor contra enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  que contra otras enzimas PI3-quinasas u otras quininas. Dichos compuestos poseen una potencia contra enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  tal que pueden utilizarse en una cantidad suficiente para inhibir enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  y al mismo tiempo demostrar escasa actividad contra la enzima PI3K- $\beta$  y contra la mayoría de las otras enzimas quininas. Dichos compuestos probablemente sean útiles para la inhibición selectiva de enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  y probablemente sean útiles para el tratamiento efectivo de, por ejemplo tumores impulsados por enzimas PI3K- $\alpha$  y/o - $\delta$ .
- 20 De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente para su uso para proporcionar un efecto inhibitorio selectivo de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .
- 25 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso para proporcionar un efecto inhibitorio selectivo de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .
- De acuerdo con un aspecto adicional de la invención también se proporciona un método para proporcionar un efecto inhibitorio selectivo de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.
- 30 “Un efecto inhibitorio selectivo de la enzima PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ ” significa que el compuesto de Fórmula (I) es más potente contra enzimas PI3K- $\alpha$  y - $\delta$  que contra otras PI3-quininas de clase 1 y generalmente muestran buena selectividad con respecto a otros miembros de la familia más amplia de PI3-quininas y en las clases más amplias de enzimas quininas que comprenden tirosina y ser/thr quininas.
- 35 De acuerdo con una característica adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define en la presente anteriormente, para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, cánceres de estómago (gástrico) y esófago, cáncer de pulmón de célula no pequeña (NSCLC) incluyendo carcinomas de células escamosas (SCC) y adenocarcinoma, SCC de cabeza y cuello, cánceres ginecológicos (incluyendo de endometrio, ovario y cuello de útero) y de cánceres hematológicos tal como mieloma múltiple, linfomas y leucemias (incluyendo leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfoblástica aguda (ALL) y linfoma de células del manto (MCL)).
- 40 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define en la presente anteriormente, para su uso en el tratamiento de cáncer de vejiga, cerebro/SNC, colorrectal, de pulmón (todas las otras formas), vesícula biliar y ducto biliar y piel.
- 45 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define en la presente anteriormente, para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, huesos, riñón, hígado, melanoma, tejido gastrointestinal, páncreas, testículos, tiroides, pene, vulva y otros tipos de tumores con una dependencia de PI3-quinasa a través de mutación, amplificación u otras aberraciones.
- 50 De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de mama, cánceres de estómago (gástrico) y esófago, NSCLC incluyendo SCC y adenocarcinoma, SCC de cabeza y cuello, cánceres ginecológicos (incluyendo de endometrio, ovario y cuello de útero) y de cánceres hematológicos tal como mieloma múltiple, linfomas y leucemias (incluyendo CLL, ALL y MCL) en un animal de sangre caliente tal como el hombre que necesita dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la
- 55

presente.

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de vejiga, cerebro/SNC, colorrectal, de pulmón (todas las otras formas), vesícula biliar y ducto biliar y piel en un animal de sangre caliente tal como el hombre que necesita dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona un método para el tratamiento de cáncer de próstata, huesos, riñón, hígado, melanoma, tejido gastrointestinal, páncreas, testículos, tiroides, pene, vulva y otros tipos de tumores con una dependencia de PI3-quinasa a través de mutación, amplificación u otras aberraciones, en un animal de sangre caliente tal como el hombre que necesita dicho tratamiento que comprende administrar una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente.

De acuerdo con una característica adicional de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de mama, cánceres de estómago (gástrico) y esófago, NSCLC incluyendo SCC y adenocarcinoma, SCC de cabeza y cuello, cánceres ginecológicos (incluyendo de endometrio, ovario y cuello de útero) y de cánceres hematológicos tal como mieloma múltiple, linfomas y leucemias (incluyendo CLL, ALL y MCL).

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de vejiga, cerebro/SNC, colorrectal, de pulmón (todas las otras formas), vesícula biliar y ducto biliar y piel.

De acuerdo con una característica adicional de este aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se define anteriormente en la presente en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, huesos, riñón, hígado, melanoma, tejido gastrointestinal, páncreas, testículos, tiroides, pene, vulva y otros tipos de tumores con una dependencia de PI3-quinasa a través de mutación, amplificación u otras aberraciones.

En una característica de la invención, el cáncer a ser tratado es cáncer de mama. En un aspecto adicional de esta característica, el cáncer de mama es +vo para receptores de estrógeno. En una realización de este aspecto, el compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se dosifica en combinación con un agente anti-hormonal tal como se define en la presente. En otra realización de este aspecto, el Ejemplo 3 se dosifica en combinación con un agente anti-hormonal tal como se define en la presente. En una realización adicional de este aspecto, el Ejemplo 3 se dosifica en combinación con olaparib, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y opcionalmente, además, en combinación con un agente anti-hormonal tal como se define en la presente. En una realización adicional de este aspecto, el Ejemplo 3 se dosifica en combinación con AZD5363, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y opcionalmente, además, en combinación con un agente anti-hormonal tal como se define en la presente.

En un aspecto donde se indica el tratamiento del cáncer, debe comprenderse que esto puede hacer referencia a la prevención de metástasis y al tratamiento de las metástasis, es decir, la extensión del cáncer. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden utilizarse para tratar a un paciente no tiene metástasis para detenerlas, o para extender el período de tiempo antes de que ocurran, y a un paciente que ya tiene metástasis para tratar las propias metástasis.

Asimismo, el tratamiento del cáncer puede hacer referencia al tratamiento de un tumor o tumores primarios establecidos y a un tumor o tumores primarios en desarrollo. Por lo tanto, en un aspecto, el tratamiento del cáncer se refiere a la prevención de la metástasis. En otro aspecto de la invención, el tratamiento del cáncer se refiere al tratamiento de metástasis. En otro aspecto de la invención el tratamiento del cáncer se refiere al tratamiento de un tumor o tumores primarios establecidos o tumor o tumores primarios en desarrollo.

Como se indicó anteriormente en la presente, los efectos in vivo de un compuesto de Fórmula (I) pueden producirse en parte por uno o más metabolitos (tales como compuestos de fórmula A tal como se definió anteriormente) que se forman en el cuerpo humano o animal después de la administración de un compuesto de Fórmula (I).

Compuestos particulares de la invención poseen mejor potencia contra la PI3-quinasa- $\alpha$  y  $-\delta$  que contra otras isoformas de PI3-quinasa de clase 1 tales como  $-\beta$  y  $-\gamma$ . En un aspecto, los compuestos de la invención son selectivos para PI3K- $\alpha$  y  $-\delta$  comparados con PI3K- $\beta$  o  $-\gamma$ .

Por lo tanto, la presente invención también contempla un método para inhibir la PI3-quinasa  $-\alpha$  en un paciente, que comprende administrar a un paciente una cantidad del compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, efectiva para inhibir la fosfoinositida 3-quinasa- $\alpha$  en el paciente.

Por lo tanto, la presente invención también contempla un método para inhibir la PI3-quinasa  $-\alpha$  y  $\delta$  en un paciente, que

comprende administrar a un paciente una cantidad del compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, efectiva para inhibir la PI3-quinasa- $\alpha$  y - $\delta$  en el paciente.

El compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es un inhibidor de PI3-quinasa, también tiene usos terapéuticos potenciales en una variedad de otros estados de enfermedad. Por ejemplo, la PI3-quinasa juega un papel importante para promover la proliferación del músculo liso en el árbol vascular, es decir, las células de músculo liso vasculares (Thyberg, *European Journal of Cell Biology*, 1998, 76(1), 33-42), y en los pulmones (células de músculo liso de las vías respiratorias), Krymskaya, V.P., *BioDrugs*, 2007, 21(2), 85-95. La proliferación excesiva de células de músculo liso vasculares juega un papel importante en la formación de placas ateroscleróticas y en el desarrollo de hiperplasia neointima tras procedimientos vasculares invasivos (Scwartz et al., *Progress in Cardiovascular Disease*, 1984, 26, 355-372; Clowes et al., *Laboratory Investigations*, 1978, 39, 141-150. Además, la proliferación excesiva de células de músculo liso de las vías respiratorias produce el desarrollo de EPOC en el establecimiento del asma y la bronquitis crónica. Los inhibidores de la actividad de PI3-quinasa pueden utilizarse para prevenir la restenosis vascular, aterosclerosis y EPOC.

La PI3-quinasa también juega un papel importante en la función de los leucocitos (Fuller et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 162(11), 6337-6340; Eder et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(43), 28025-31) y la función de los linfocitos (Vicente-Manzanares et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 163(7), 4001-4012). Por ejemplo, la adhesión de los leucocitos al endotelio inflamado implica la activación de las integrinas de leucocitos endógenos mediante un proceso de señalización dependiente de PI3-quinasa. Asimismo, la explosión oxidativa (Nishioka et al., *FEBS Letters*, 1998, 441(1), 63-66 y Condliffe, A.M., et al., *Blood*, 2005, 106(4), 1432-40) y reorganización citoesquelética (Kirsch et al., *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 1999, 96(11), 6211-6216) en neutrófilos parece implicar la señalización de PI3-quinasa. La migración de los neutrófilos y el movimiento direccional también dependen de la actividad de PI3-quinasa (Camps, M., et al., *Nat Med*, 2005, 11(9), 936-43 y Sadhu, C. et al., *J Immunol*, 2003, 170(5), 2647-54). De esta forma, los inhibidores de PI3-quinasa pueden ser útiles para reducir la adhesión de los leucocitos y la activación en sitios de inflamación y, por lo tanto, pueden usarse para tratar trastornos inflamatorios agudos y/o crónicos. La PI3-quinasa también juega un papel importante en la proliferación y activación de los linfocitos, Fruman et al., *Science*, 1999, 283 (5400), 393-397. En particular, PI3K- $\delta$  es esencial para el desarrollo y la función de las células B, incluida la proliferación de células B inducida por anticuerpos específicos de IgM (Okkenhaug K et al., *Science*, 2002, 297(5583), 1031-1034), síntesis y proliferación de ADN inducida por el receptor de células B, y supervivencia inducida por IL-4 (Bilancio A et al., *Blood*, 2006, 107, 642-650). Estas observaciones indican que PI3K- $\delta$  tiene un papel fundamental y no redundante en la función de las células B que no es compensado por otras PI3K de clase I. Dado el papel importante de los linfocitos en enfermedades autoinmunitarias, un inhibidor de la actividad de PI3-quinasa puede utilizarse en el tratamiento de dichos trastornos (Rommel C, Camps M and Ji H, *Nat Rev Immunol*, 2007, 1038, 191-201).

El tratamiento anti-cáncer definido en la presente puede aplicarse como terapia única o puede implicar, además del compuesto de la invención, cirugía o radioterapia o quimioterapia convencionales. Dicha quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes anti-tumorales:

(i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, tal como se emplean en la oncología médica, como agentes alquilantes (por ejemplo cis-platina, oxaliplatina, carboplatina, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucil, busulfán, temozolamida y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, gemcitabina y antifolatos como fluoropirimidinas tal como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinosida e hidroxiurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo: antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimitóticos (por ejemplo alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotere e inhibidores de poloquinasa); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etoposida y teniposida, amsacrina, topotecán y camptotecina);

(ii) agentes antihormonales tales como antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5 $\alpha$ -reductasa como finasterida;

(iii) inhibidores de la función del factor del crecimiento y sus vías de señalización corriente abajo:

se incluyen moduladores de Ab y cualquier factor de crecimiento u objetivos del receptor del factor de crecimiento, descritos por Stern et al. *Critical Reviews in Oncology/Haematology*, 2005, 54, págs. 11-29); también se incluyen inhibidores de molécula pequeña de dichos objetivos, por ejemplo, inhibidores de quinasa - ejemplos incluyen el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], el anticuerpo anti-EGFR panitumumab, el anticuerpo anti-EGFR cetuximab [Erbitux, C225] e inhibidores de tirosina quinasa que incluyen la familia del receptor de erbB, tales como los inhibidores de tirosina quinasa de la familia de factor de crecimiento epidérmico (EGFR/erbB1) tales como gefitinib o erlotinib, inhibidores de tirosina quinasa de erbB2 tales como lapatinib, e inhibidores mixtos erb1/2 tales como afatinib; estrategias similares están disponibles para otras clases de factores de crecimiento y sus receptores, por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos o sus receptores, incluidos c-met y ron; inhibidores de

insulina y la familia del factor de crecimiento de la insulina o sus receptores (IGFR, IR), inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas o sus receptores (PDGFR), e inhibidores de señalización mediada por otras tirosina quinasas receptoras, tales como c-kit, AnLK y CSF-1R;

5 también se incluyen moduladores que se dirigen a las proteínas de señalización en la vía de señalización de PI3-quinasa más amplia, por ejemplo, inhibidores de otras isoformas de PI3-quinasa tales como PI3K-β, y ser / thr quinasas tales como AKT, mTOR, PDK, SGK, PI4K o PIP5K;

10 también se incluyen inhibidores de serina/treonina quinasas no mencionados anteriormente, por ejemplo, inhibidores de raf tales como vemurafenib, inhibidores de MEK tales como selumetinib (AZD6244), inhibidores de Abl tales como imatinib o nilotinib, inhibidores de Btk tales como ibrutinib, inhibidores de Syk tales como fostamatinib, inhibidores de aurora quinasa (por ejemplo AZD1152), inhibidores de otras ser/thr quinasas tales como JAK, STAT e IRAK4, e inhibidores de quinasa dependientes de ciclina;

iv) moduladores de las vías de señalización de daño de ADN, por ejemplo, inhibidores de PARP (por ejemplo, Olaparib), inhibidores de ATR o inhibidores de ATM;

15 v) moduladores de vías apoptóticas y de muerte celular, tales como moduladores de la familia Bcl (por ejemplo, ABT-263 / Navitoclax, ABT-199);

20 (vi) agentes antiangiogénicos, tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular [por ejemplo, el anticuerpo anti-factor del crecimiento celular endotelial vascular bevacizumab (Avastin™) y, por ejemplo, un inhibidor de tirosina quinasa del receptor de VEGF, tal como sorafenib, axitinib, pazopanib, sunitinib y vandetanib y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de la integrina αvβ3 y angiostatina)];

(vii) agentes que producen daños vasculares como Combretastatina A4;

(viii) agentes anti-invasión, por ejemplo, inhibidores de la familia de c-Src quinasa como dasatinib (J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) y bosutinib (SKI-606) e inhibidores de metaloproteínasa como marimastat, inhibidores de la función del receptor activador del plasminógeno de uroquinasa o anticuerpos contra la Heparanasa;

25 (ix) abordajes de inmunoterapia, incluyendo, por ejemplo, abordajes ex vivo e in vivo para incrementar la inmunogenicidad de las células tumorales de los pacientes, como en la transfección con citoquinas como interleuquina 2, interleuquina 4 o el factor de estimulación de la colonia de granulocitos-macrófagos, abordajes para disminuir la anergia de las células T, abordajes que utilizan células inmunes transfectadas como células dendríticas transfectadas con citoquina, abordajes que emplean líneas de células tumorales transfectadas con citoquinas y abordajes que emplean anticuerpos anti-idiotípicos. Ejemplos específicos incluyen anticuerpos monoclonales que se dirigen a PD-1 (por ejemplo, BMS-936558) o CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab y tremelimumab);

(x) terapias antisentido o basadas en ARNi, por ejemplo, aquellas que están dirigidas a los objetivos enumerados;

35 (xi) abordajes de terapia genética, incluyendo por ejemplo, el reemplazo de genes aberrantes como el aberrante p53 o los aberrantes BRCA1 o BRCA2, los abordajes de la GDEPT (terapia de pro-fármaco de enzimas dirigidas por genes) como los que emplean deaminasa citosina, timidina quinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana y abordajes para incrementar la tolerancia de los pacientes a la quimioterapia o la radioterapia, como la terapia genética de resistencia multi-fármaco.

40 De acuerdo con este aspecto de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y otro agente antitumoral, en particular cualquiera de los agentes antitumorales enumerados en (i) – (xi) anteriormente. En particular, el agente antitumoral enumerado en los literales (i)-(xi) anteriores es el estándar de atención para el cáncer específico a tratar; el experto en la técnica comprenderá el significado de "estándar de atención".

45 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral que se selecciona de uno de los enumerados en (i) – (xi) anteriormente.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral que se selecciona de uno de los enumerados en (i) anteriormente.

50 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y cualquiera de los agentes antitumorales enumerados anteriormente en (i).

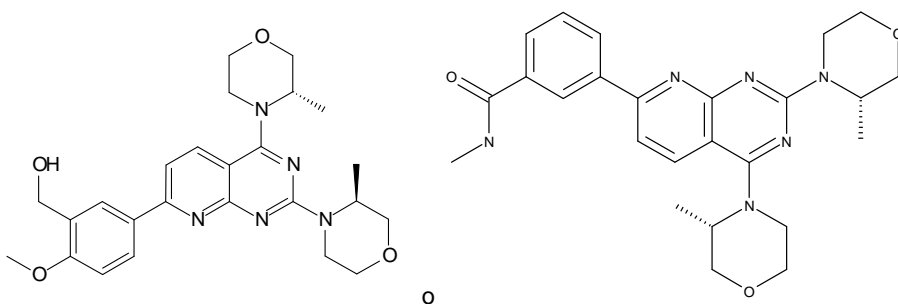
En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de

cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un taxoide, tal como, por ejemplo, taxol o taxotere, convenientemente taxotere.

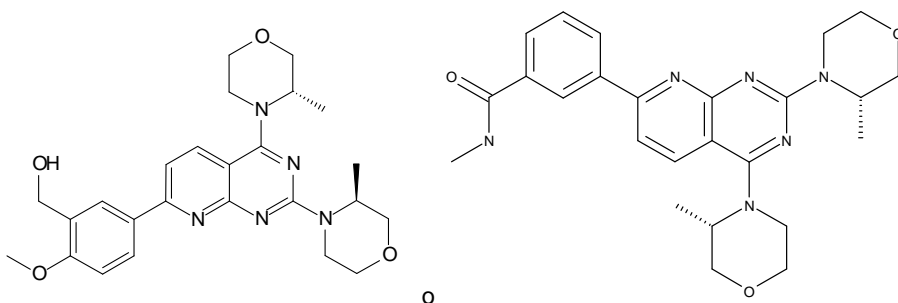
5 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con otro agente antitumoral, en particular un agente antitumoral que se selecciona de uno de los enumerados en (ii) anteriormente en la presente.

10 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y cualquiera de los agentes antihormonales enumerados anteriormente en (ii), por ejemplo cualquiera de los antiestrógenos enumerados anteriormente en (ii).

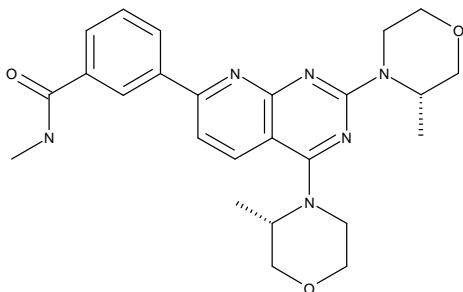
En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un inhibidor de mTOR, tal como los descritos en el documento WO2008/023161, por ejemplo



15 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de mTOR, tal como los divulgados en el documento WO2008/023161, por ejemplo



20 En particular, el inhibidor de mTOR es AZD2014, que tiene la siguiente estructura:



En un aspecto, la precedente combinación del compuesto de fórmula (I) y AZD2014 es adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer de mama ER+vo, opcionalmente en combinación con terapia hormonal de referencia.

25 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un inhibidor de PI3K-β.

La combinación de un compuesto de fórmula (I) con un inhibidor de PI3K-β puede ser particularmente útil en el tratamiento de tumores, por ejemplo, de próstata, mama (por ejemplo de mama triple negativo), NSCLC de células



escamosas y cáncer renal, con un antecedente de pérdida de PTEN.

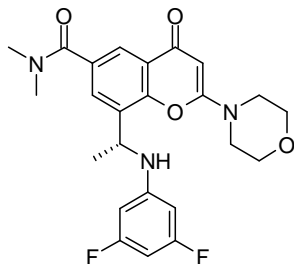
En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de PI3K- $\beta$ .

- 5 En un aspecto, los inhibidores de PI3K- $\beta$  descritos en la presente también presentan cierta actividad inhibitoria de PI3K- $\delta$ .

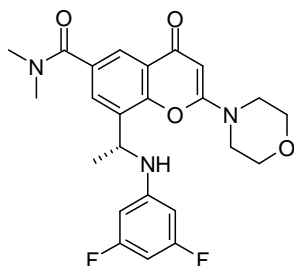
En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un inhibidor de PI3K- $\beta$ , tal como cualquiera de los Ejemplos en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704.

- 10 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de PI3K- $\beta$ , tal como cualquiera de los ejemplos de la solicitud internacional de patente WO2011/051704.

- 15 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un inhibidor de PI3K- $\beta$  y PI3K- $\delta$ , tal como 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenil-amino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (Ejemplo 3.06b en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, también conocido como AZD8186) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



- 20 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de PI3K- $\beta$  y PI3K- $\delta$ , tal como 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenil-amino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (ejemplo 3.06b en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, también conocido como AZD8186) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



- 25 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un inhibidor de AKT quinasa, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida (AZD5363) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (ver por ejemplo WO2009/047563).

- 30 La combinación de un compuesto de Fórmula (I) y un inhibidor de AKT puede ser particularmente útil en el tratamiento de tumores con una mayor prevalencia en la mutación del gen PIK3CA, tal como cáncer de mama ER+vo, de endometrio, de ovario, NSCLC de células escamosas, cáncer gástrico, de vejiga y del tracto biliar.

- 35 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un inhibidor de AKT quinasa, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida (AZD5363) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (ver por ejemplo WO2009/047563).

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con olaparib (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-

2H-ftalazin-1-ona) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La combinación de un compuesto de Fórmula (I) y olaparib puede ser particularmente útil tanto en cáncer de mama triple negativo, BRCA tipo salvaje o deficiente, como en cáncer de mama positivo para receptores de estrógeno (ER+vo), particularmente aquellos con mutaciones en el gen PIK3CA.

5 En un aspecto adicional de la invención se proporciona una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se define anteriormente en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y olaparib (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2H-ftalazin-1-ona) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Combinaciones particulares de la invención comprenden cualquiera de los compuestos de los Ejemplos en la presente (o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos) y un inhibidor de mTOR, inhibidor de PI3K $\beta$ , inhibidor de AKT quinasa u olaparib como se describe anteriormente en la presente. Combinaciones particulares adicionales de la invención comprenden el Ejemplo 3 (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un inhibidor de mTOR, inhibidor de PI3K $\beta$ , inhibidor de AKT quinasa u olaparib como se describe anteriormente en la presente. Combinaciones particulares adicionales de la invención comprenden el Ejemplo 3 (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un inhibidor de PI3K $\beta$ , inhibidor de AKT quinasa u olaparib (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres), como se describe anteriormente en la presente. Otros ejemplos adicionales particulares de combinaciones de la invención comprenden el Ejemplo 3 (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y cualquiera de AZD8186, AZD5363 y olaparib (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres). Otro ejemplo de una combinación de la invención comprende el Ejemplo 3 y AZD2014.

20 En todas las combinaciones anteriores, se comprenderá que la combinación también puede dosificarse con tratamiento de referencia, como entenderá un experto en la técnica, tal como otros tratamientos a partir de (i) a (xi) anteriormente en la presente. Por ejemplo, cuando se pretende utilizar cualquiera de las combinaciones anteriores para el tratamiento de cáncer de mama ER+vo, terapias hormonales de referencia (tales como los agentes descritos anteriormente en (ii)) pueden utilizarse junto con la combinación de la invención. En otros aspectos, de forma adecuada la referencia puede seleccionarse del numeral (i) anteriormente mencionado.

25 Por lo tanto en un aspecto adicional de la invención, se proporciona una combinación triple adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer

- a) un compuesto de fórmula (I) (tal como el Ejemplo 3) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;
- 30 b) un inhibidor de mTOR, inhibidor de PI3K $\beta$ , inhibidor de AKT quinasa u olaparib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
- c) terapia de referencia para el cáncer a tratar.

De forma adecuada, la terapia de referencia puede dosificarse de acuerdo con su régimen normal de dosificación, como entenderá un experto en la técnica.

35 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

40 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

45 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con AZD5363, AZD8186 u olaparib, (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres) en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de cáncer.

50 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de cáncer.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el

Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con AZD5363, AZD8186 u olaparib, (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres) en asociación con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de cáncer.

5 De acuerdo con otra característica de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en la fabricación de un medicamento para su uso en cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre.

10 De acuerdo con otra característica de la invención se proporciona el uso del Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente, en la fabricación de un medicamento para su uso en cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre.

15 De acuerdo con otra característica de la invención se proporciona el uso del Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con AZD5363, AZD8186 u olaparib, (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres) en la fabricación de un medicamento para su uso en cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre.

Por lo tanto en una característica adicional de la invención, se proporciona un método para tratar cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente.

20 Por lo tanto en una característica adicional de la invención, se proporciona un método para tratar cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva del Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente.

25 Por lo tanto en una característica adicional de la invención, se proporciona un método para tratar cáncer en un animal de sangre caliente, tal como el hombre, que necesita dicho tratamiento que comprende administrar a dicho animal una cantidad efectiva del Ejemplo 3 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con AZD5363, AZD8186 u olaparib (o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de estos tres).

30 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en combinación con un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;

35 b) un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente en una segunda forma de dosificación unitaria; y

c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;

40 b) un agente anti-tumoral que se selecciona de uno descrito como (i) – (xi) en la presente anteriormente en una segunda forma de dosificación unitaria;

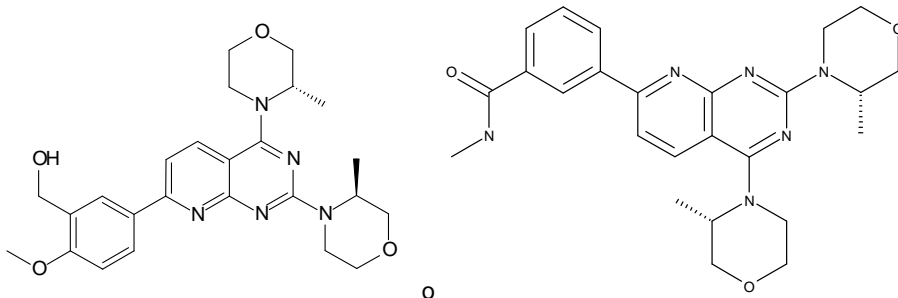
c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente

d) instrucciones para su uso.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

45 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;

b) un inhibidor de mTOR, tal como los descritos en el documento WO2008/023161, por ejemplo



en una segunda forma de dosificación unitaria; y

c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- 5 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) un inhibidor de PI3K- $\beta$ , tal como cualquiera de los Ejemplos en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.
- 10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:
- a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) un inhibidor de PI3K- $\beta$ , tal como cualquiera de los Ejemplos en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una segunda forma de dosificación unitaria;
- 15 c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente
- d) instrucciones para su uso.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- 20 b) un inhibidor de PI3K- $\beta$  y PI3K- $\delta$  que es 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (Ejemplo 3.06b en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, también conocido como AZD8186), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.
- De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:
- 25 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) un inhibidor de PI3K- $\beta$  y PI3K- $\delta$  que es 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (Ejemplo 3.06b en la Solicitud de Patente Internacional WO2011/051704, también conocido como AZD8186), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una segunda forma de dosificación unitaria;
- 30 c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente
- d) instrucciones para su uso.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- 35 b) un inhibidor de AKT quinasa, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AZD5363, ver por ejemplo WO2009/047563), en una segunda forma de dosificación unitaria;

- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente
- d) instrucciones para su uso.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- 5 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) un inhibidor de AKT quinasa, tal como (S)-4-amino-*N*-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AZD5363, ver por ejemplo WO2009/047563), en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- 15 b) un inhibidor de AKT quinasa, tal como (S)-4-amino-*N*-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7*H*-pirrolo[2,3-*d*]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (AZD5363, ver por ejemplo WO2009/047563), en una segunda forma de dosificación unitaria;
- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente
- d) instrucciones para su uso.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- 20 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) olaparib (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2*H*-ftalazin-1-ona) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una segunda forma de dosificación unitaria; y
- c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención se proporciona un kit que comprende:

- 25 a) un compuesto de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en una primera forma de dosificación unitaria;
- b) olaparib (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-bencil]-2*H*-ftalazin-1-ona) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una segunda forma de dosificación unitaria;
- 30 c) un medio para contener dichas primera y segunda formas de dosificación; y opcionalmente
- d) instrucciones para su uso.

En todas las combinaciones anteriores, los usos, métodos de tratamiento y kits, AZD5363, AZD8186 y olaparib pueden presentarse en forma de bases libres o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto en una realización AZD5363 se encuentra en forma de una base libre; en una realización adicional AZD5363 se encuentra en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización AZD8186 se encuentra en forma de una base libre; en una realización adicional AZD8186 se encuentra en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. En otra realización olaparib se encuentra en forma de una base libre; en una realización adicional olaparib se encuentra en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

40 Aunque los compuestos de la fórmula (I) son principalmente de valor como agentes terapéuticos para su uso en animales de sangre caliente (incluyendo el hombre), también son útiles siempre que sean necesarios para inhibir los efectos de PI3-quinasa- $\alpha$  y - $\delta$ . De esta forma, son útiles como estándares farmacológicos para su uso en el desarrollo de nuevas pruebas biológicas y en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos.

En la presente, cuando se utiliza el término "combinación" se comprenderá que esto se refiere a la administración simultánea, separada o secuencial. En un aspecto de la invención "combinación" se refiere a la administración simultánea. En otro aspecto de la invención "combinación" se refiere a la administración separada. En un aspecto adicional de la invención "combinación" se refiere a la administración secuencial. Cuando la administración es secuencial o separada, el retraso en la administración del segundo componente no debería ser tal que se pierda el efecto beneficioso.

- En una realización el tratamiento secuencial implica la administración de cada componente de la combinación en un período de 11 días. En otra realización este período es de 10 días. En otra realización este período es de 9 días. En otra realización este período es de 8 días. En otra realización este período es de 7 días. En otra realización este período es a lo sumo 6 días. En otra realización este período es a lo sumo 5 días. En otra realización este período es a lo sumo 4 días. En otra realización este período es a lo sumo 3 días. En otra realización este período es a lo sumo 2 días. En otra realización este período es a lo sumo 24 horas. En otra realización este período es a lo sumo 12 horas.
- Tanto la administración secuencial como la co-administración se ejemplifican en la presente en los experimentos de combinación con el Ejemplo 3 y AZD5363 en el modelo BT474. En este ejemplo, la administración secuencial se ilustra mediante dosificación de AZD5363 durante 2 días y luego el Ejemplo 3 durante 2 días, luego 3 días sin dosis de ninguno de los agentes antes de repetir el patrón ("ciclo de dosificación"). La co-administración se ilustra con un régimen de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican durante 2 días y los siguientes 5 días sin dosis de ninguno de los agentes. En estos dos ejemplos, la administración secuencial parece ser más efectiva en la regresión tumoral, lo que ilustra la importancia potencial de optimizar el régimen. Otros regímenes de co-dosificación potenciales incluyen:
- 1) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican durante 2 días y los siguientes 3 días sin dosis de ninguno de los agentes;
  - 2) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican durante 3 días y los siguientes 4 días sin dosis de ninguno de los agentes;
  - 3) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican durante 4 días y los siguientes 3 días sin dosis de ninguno de los agentes;
  - 4) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican durante 5 días y los siguientes 2 días sin dosis de ninguno de los agentes
  - 5) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican día por medio
  - 6) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican cada tres días
  - 7) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican semanalmente con intervalos de 3 y 4 días entre las dosificaciones (por ejemplo Lunes / Jueves)
  - 8) un ciclo de dosificación en donde AZD5363 y el Ejemplo 3 se dosifican semanalmente con intervalos de 2 y 3 días entre las dosificaciones (por ejemplo Lunes / Miércoles / Viernes).
- Combinaciones de compuestos de fórmula (I), particularmente el Ejemplo 3, con un inhibidor de mTOR, tal como AZD2014 o un inhibidor de PI3K- $\beta$  (tal como el inhibidor  $\beta/\delta$  AZD8186) puede, de forma adecuada, dosificarse en un régimen similar a los descritos anteriormente para la combinación del Ejemplo 3 y AZD5363.
- Una combinación de un compuesto de fórmula (I) y olaparib puede dosificarse de acuerdo con un régimen en donde olaparib se dosifica diariamente y el compuesto de fórmula (I) se dosifica de acuerdo con un esquema de dosificación intermitente (tal como, por ejemplo, 2 días de dosificación y luego 3 a 5 días sin dosificación).
- Cada uno de estos regímenes de dosificación ilustrativos comprende un aspecto adicional de la invención.
- Cada uno de estos regímenes de dosificación ilustrativos también puede aplicarse en combinaciones con otros agentes anti-tumorales enumerados en (i) - (xi) anteriormente.
- Puede resultar ventajoso, dentro de un ciclo de dosificación dado, administrar un componente específico de la combinación antes del otro – es decir dosificación secuencial.
- Por lo tanto, en una realización la administración secuencial comprende la administración secuencial del compuesto de fórmula (I) (particularmente Ejemplo 3) antes de la administración del otro agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi), particularmente un agente anti-tumoral que se selecciona de AZD5363, AZD8186 y olaparib, dentro de un ciclo de dosificación.
- En otra realización la administración secuencial comprende la administración secuencial del agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi), particularmente un agente anti-tumoral que se selecciona de AZD5363, AZD8186 y olaparib, antes de la administración de un compuesto de Fórmula (I) (particularmente Ejemplo 3) dentro de un ciclo de dosificación.
- En una realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un intervalo de hasta 2 días. En otra realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un intervalo de hasta 1 día. En otra realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un intervalo de hasta 18 horas. En otra realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un

intervalo de hasta 12 horas. En otra realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un intervalo de hasta 6 horas. En otra realización, el agente anti-tumoral descrito anteriormente en (i) a (xi) y el compuesto de fórmula (I) se dosifican con un intervalo de hasta 3 horas.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 5 a 10 días de duración.

5 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 6 a 10 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 7 a 9 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 6 a 8 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 10 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 9 días de duración.

10 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 8 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 7 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 6 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede ser de 5 días de duración.

15 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 2-4 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 6 a 9 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 3-4 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 6 a 9 días de duración; (por ejemplo, 7 días de duración).

20 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 3-5 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 7 a 10 días de duración.

25 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 5 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 6 a 9 días de duración.

En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 4 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 6 a 9 días de duración; (por ejemplo, 7 días de duración).

30 En realizaciones adicionales el ciclo de dosificación puede implicar que el compuesto de fórmula (I) (particularmente el Ejemplo 3) se dosifique durante 3 días consecutivos y no se dosifiquen durante los otros días dentro de un ciclo de dosificación de 6 a 9 días de duración.

Los ciclos de dosificación pueden estar separados por un número de días en los que no se administren ninguno de los componentes de combinación activos.

35 La terapia de combinación como se describe anteriormente puede agregarse a la terapia de referencia típicamente llevada a cabo de acuerdo con su esquema de dosificación recomendado.

#### Atención médica personalizada

40 Otro aspecto de la presente invención se basa en identificar un enlace entre el estado del gen que codifica fosfoinositida-3-quinasa, polipéptido catalítico alfa (PIK3CA) y la susceptibilidad al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). Por lo tanto, esto proporciona oportunidades, métodos y herramientas para seleccionar pacientes para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), particularmente pacientes con cáncer, y/o evitar el tratamiento en pacientes con menos posibilidad de responder terapéuticamente al tratamiento, evitando así un tratamiento innecesario y cualquier efecto secundario que pueda asociarse con dicho tratamiento no efectivo.

45 La presente invención se refiere a herramientas y métodos de selección de pacientes (incluyendo medicina personalizada). La selección se basa en si las células tumorales a tratar poseen un gen PIK3CA tipo salvaje o mutante. El estado del gen PIK3CA puede utilizarse, por lo tanto, como un biomarcador de susceptibilidad al tratamiento con un inhibidor de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ .

Existe una necesidad clara de biomarcadores que enriquecerán o seleccionarán pacientes cuyos tumores respondan al tratamiento con un inhibidor de PI3K- $\alpha$  y - $\delta$ , tal como un compuesto de Fórmula (I). Los biomarcadores de selección de

pacientes que identifican los pacientes con más posibilidad de responder a un agente son ideales en el tratamiento del cáncer, ya que reducen el tratamiento innecesario de pacientes con tumores sin respuesta a los efectos secundarios potenciales de dichos agentes.

5 Un biomarcador puede describirse como "una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica". Un biomarcador es cualquier indicador identificable y mensurable asociado con una afección o enfermedad particular donde existe una correlación entre la presencia o el nivel del biomarcador y algún aspecto de la afección o enfermedad (incluyendo la presencia, el nivel o nivel cambiante, el tipo, la etapa y la susceptibilidad a la afección o enfermedad o la respuesta a un fármaco utilizado para tratar la afección o enfermedad). La correlación puede ser cualitativa, cuantitativa o cualitativa y cuantitativa. Típicamente un biomarcador es un compuesto, fragmento de compuesto o grupo de compuestos. Dichos compuestos pueden ser cualquier compuesto encontrado en o producido por un organismo, incluidas proteínas (y péptidos), ácidos nucleicos y otros compuestos.

15 Los biomarcadores pueden tener un poder predictivo y, como tales, pueden utilizarse para predecir o detectar la presencia, nivel, tipo o etapa de afecciones o enfermedades particulares (incluyendo la presencia o el nivel de microorganismos o toxinas particulares), la susceptibilidad (incluyendo susceptibilidad genética) a afecciones o enfermedades particulares o la respuesta a tratamientos particulares (incluyendo tratamientos con fármacos). Se cree que los biomarcadores jugarán un papel cada vez más importante en el futuro del descubrimiento y desarrollo de fármacos mediante la mejora de la eficiencia de programas de investigación y desarrollo. Los biomarcadores pueden utilizarse como agentes de diagnóstico, monitores del avance de una enfermedad, monitores de tratamiento e indicadores de resultado clínico. Por ejemplo, varios proyectos de investigación de biomarcadores intentan identificar marcadores de cánceres específicos y de enfermedades cardiovasculares e inmunológicas específicas. Se cree que el desarrollo de nuevos biomarcadores validados conducirá a reducciones significativas en la atención médica y los costos de desarrollo de fármacos y a mejora significativas en el tratamiento para una amplia variedad de enfermedades y afecciones.

25 Puede requerirse un biomarcador con el fin de diseñar opcionalmente pruebas clínicas y de obtener la mayor información de estas pruebas. El marcador puede ser mensurable en tejidos sustitutos y tumorales. Idealmente, estos marcadores también se correlacionarán con la eficacia y, por lo tanto, podrían utilizarse, en última instancia, para la selección de pacientes.

30 Por lo tanto, el problema técnico que subyace este aspecto de la presente invención es la identificación de medios para la estratificación de pacientes para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). El problema técnico se resuelve mediante la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y/o descripción en la presente.

Como se detalla en los ejemplos en la presente, se encontró que las células que poseen una mutación en PIK3CA son generalmente más susceptibles a la inhibición del crecimiento por parte del compuesto de Fórmula (I).

35 La invención proporciona un método para determinar la sensibilidad de células a un compuesto de Fórmula (I). El método comprende determinar el estado del gen PIK3CA en dichas células. Las células se identifican como posiblemente sensibles a un compuesto de la Fórmula (I) si las células poseen un gen PIK3CA mutado. Por lo tanto, se prevé que aquellos pacientes con un gen PIK3CA mutado son particularmente susceptibles al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). Una célula se define como sensible a un compuesto de Fórmula (I) si inhibe el aumento en el número de células en un ensayo de crecimiento celular (ya sea a través de la inhibición de la proliferación celular y/o a través de una mayor destrucción celular). Los métodos de la invención son útiles para predecir qué células tienen más posibilidad de responder a un compuesto de Fórmula (I) mediante inhibición del crecimiento.

40 La presente invención está basada además, en parte, en métodos que pueden utilizarse para determinar la respuesta de un paciente a un compuesto de Fórmula (I), incluyendo determinar si administrar o no un compuesto de Fórmula (I). Específicamente, los métodos de la presente invención incluyen la determinación del estado del gen de PIK3CA. La presencia de un gen PIK3CA mutado indica que las células tumorales tienen más posibilidad de responder mediante inhibición del crecimiento cuando están en contacto con un compuesto de Fórmula (I). El estado del gen PIK3CA puede utilizarse entonces para seleccionar pacientes para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I).

45 Además, se divulga un método in vitro para la identificación de un paciente que posiblemente sea sensible a un compuesto de Fórmula (I). También se divulgan usos para cebadores o sondas de oligo- o polinucleótidos capaces de detectar el estado de mutación del gen PIK3CA proporcionado. También se divulgan usos de kits para la detección de mutaciones de PIK3CA incluyendo, a modo no taxativo, los kits de detección de mutación de PIK3CA comercializados por compañías de diagnóstico, incluidas Qiagen y Roche Molecular Systems. En otra realización, la invención se refiere a un método in vitro para determinar si es posible que un paciente que sufre de cáncer responda a un tratamiento farmacéutico con un compuesto de Fórmula (I), comprendiendo dicho método las etapas de: (i) obtener una muestra representativa del tumor que se recogió previamente de dicho paciente; y (ii) determinar si los genes PIK3CA contienen una mutación en dicha muestra. Una mutación en el gen PIK3CA es indicativa de mayor probabilidad de una respuesta al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I). Como una prueba de biomarcador de un solo gen, la identificación de tumores que contienen una mutación de PIK3CA se enriquecerá para la respuesta a un compuesto de Fórmula (I). Los tumores individuales que contienen una mutación de PIK3CA tienen la mayor probabilidad de respuesta a un compuesto



de Fórmula (I).

Una muestra "representativa del tumor" puede ser la muestra tumoral real aislada o puede ser una muestra que ha sido procesada adicionalmente, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico amplificado por PCR de la muestra tumoral.

*Definiciones:*

5 En esta sección de atención médica personalizada:

"Alelo" se refiere a una forma particular de un locus genético, distinguida de otras formas por su secuencia de nucleótidos o aminoácidos particular.

10 "Reacciones de amplificación" son reacciones de ácido nucleico que resultan en amplificación específica de ácidos nucleicos objetivo sobre ácidos nucleicos no objetivo. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es una reacción de amplificación bien conocida.

"Cáncer" se utiliza en la presente para referirse al crecimiento neoplásico que surge de la transformación celular a un fenotipo neoplásico. Dicha transformación celular a menudo implica una mutación genética.

15 "Gen" es un segmento de ADN que contiene toda la información para la biosíntesis regulada de un producto de ARN, incluyendo un promotor, exones, intrones y otros elementos de secuencia que pueden estar ubicados en las regiones de flanco 5' o 3' (no en las porciones transcritas del gen) que controlan la expresión.

"Estado de gen" se refiere a si el gen es de tipo salvaje o no (es decir mutante).

20 "Etiqueta" se refiere a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia del polinucleótido objetivo en una muestra de ensayo. Etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos, cromóforo nucleótido, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminiscentes, y similares. Como tal, una etiqueta es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

25 "Variación no sinónima" se refiere a una variación (diferencia) en o que se superpone a la secuencia codificante de un gen que resulta en la producción de una secuencia de polipéptidos distinta (alterada). Estas variaciones pueden o no afectar la función de la proteína e incluir variantes de sentido erróneo (resultando en la sustitución de un aminoácido por otro), variantes sin sentido (resultando en un polipéptido truncado debido a la generación de un codón de finalización prematuro) y variantes de inserción/eliminación.

30 "Variación sinónima" se refiere a una variación (diferencia) en la secuencia codificante de un gen que no afecta la secuencia del polipéptido codificado. Estas variaciones pueden afectar la función de la proteína indirectamente (por ejemplo, mediante la alteración de la expresión del gen) pero, a falta de evidencia en contrario, se asume que generalmente son inocuas.

"Ácido nucleico" se refiere a moléculas de ADN y ARN de una sola hebra o de doble hebra que incluyen ácidos nucleicos naturales encontrados en la naturaleza y/o ácidos nucleicos artificiales modificados que tienen las estructuras principales o bases modificadas, tal como se conoce en la técnica.

35 "Cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de ADN de una sola hebra capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a la hebra de ácido nucleico a copiar. La longitud y secuencia del cebador deben ser tales que sean capaces de preparar la síntesis de los productos de extensión. Un cebador típico contiene al menos aproximadamente 7 nucleótidos de longitud de una secuencia básicamente complementaria a la secuencia objetivo, pero se prefieren los cebadores un poco más largos. Generalmente, los cebadores contienen aproximadamente 15-26 nucleótidos, pero también pueden emplearse cebadores más largos o más cortos.

"Sitio polimórfico" es una posición en un locus en el cual al menos dos secuencias alternativas se encuentran en una población.

45 "Polimorfismo" se refiere a la variación de secuencia observada en un individuo en el sitio polimórfico. Los polimorfismos incluyen sustituciones, inserciones, eliminaciones de nucleótidos y microsátélites y pueden, aunque no necesariamente, resultar en diferencias detectables en la expresión génica o función de la proteína. A falta de evidencia de un efecto en la expresión o función de la proteína, los polimorfismos comunes, incluyendo variantes no sinónimas, se consideran generalmente incluidos en la definición de secuencia génica de tipo salvaje. Un catálogo de polimorfismos humanos y anotaciones asociadas, incluyendo validación, frecuencias observadas y asociación de enfermedades, es desarrollado por el NCBI (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Cabe señalar que el término "polimorfismo", cuando se utiliza en el contexto de secuencias génicas, no debe confundirse con el término "polimorfismo" cuando se utiliza en el contexto de forma en estado sólido de un compuesto, que es la naturaleza cristalina o amorfa de un compuesto. Un experto en la técnica comprenderá el significado deseado por el contexto.

50 "Sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de secuencias de una sola hebra que tienen una secuencia que es

exactamente complementaria a la secuencia objetivo del alelo a detectar.

"Respuesta" se define por mediciones tomadas de acuerdo con los Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos (RECIST) que implican la clasificación de pacientes en dos grupos principales: aquellos que muestran una respuesta parcial o enfermedad estable y aquellos que muestran signos de enfermedad progresiva.

- 5 "Condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a una incubación durante toda la noche a 42°C en una solución que comprende 50% de formamida, 5x de SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de trisodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7.6), 5x de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 pg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, con posterior lavado de los filtros en 0.1x de SSC a aproximadamente 65°C.

"Supervivencia" abarca la supervivencia general de los pacientes y la supervivencia sin avance.

- 10 "Supervivencia general" (OS) se define como el tiempo desde el inicio de la administración del fármaco a la muerte por cualquier causa. "Supervivencia libre de avance" (PFS) se define como el tiempo desde el inicio de la administración del fármaco a la primera aparición de la enfermedad progresiva o muerte por cualquier causa.

- 15 De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para seleccionar a un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), comprendiendo el método proporcionar una muestra que contiene células tumorales de un paciente; determinar si el gen PIK3CA en la muestra que contiene células tumorales del paciente es de tipo salvaje o mutante; y seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en base a ello.

- 20 El método puede incluir o excluir la etapa real de aislamiento de la muestra del paciente. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), comprendiendo el método determinar si el gen PIK3CA en una muestra que contiene células tumorales previamente aislada del paciente es de tipo salvaje o mutante; y seleccionar un paciente para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en base a ello.

En una realización, el paciente se selecciona para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) si el ADN de células tumorales tiene un gen PIK3CA mutante. En otras realizaciones, un paciente cuyo ADN de células tumorales posee un gen PIK3CA de tipo salvaje no se selecciona para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I).

- 25 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para predecir la respuesta de un paciente a un compuesto de Fórmula (I), comprendiendo el método determinar si el gen PIK3CA en las células tumorales del paciente es de tipo salvaje o mutante y, en base a ello, predecir la respuesta del paciente al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I).

- 30 De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para determinar la probabilidad de la efectividad del tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en un paciente humano afectado con cáncer que comprende: determinar si el gen PIK3CA en las células tumorales del paciente es de tipo salvaje o mutante y, en base a ello, predecir la respuesta del paciente al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I).

- 35 A los efectos de la presente invención, el estado del gen de tipo salvaje indica la expresión normal o apropiada del gen y la función normal de la proteína codificada. Por el contrario, el estado mutante indica la expresión génica anormal o inapropiada o expresión de una proteína con función alterada, consistente con los roles conocidos de PIK3CA mutante en cáncer (tal como se describe en la presente). Cualquier número de alteraciones genéticas o epigenéticas incluyendo, a modo no taxativo, mutación, amplificación, eliminación, redistribución genómica o cambios en el perfil de metilación, puede resultar en un estado mutante. Sin embargo, si dichas alteraciones resultan en expresión apropiada de la proteína normal o una variante funcionalmente equivalente, entonces el estado del gen se considera de tipo salvaje.
- 40 Ejemplos de variantes que resultarían típicamente en un estado del gen mutante funcional incluyen variantes de codificación sinónimas y polimorfismos comunes (sinónimos o no sinónimos). Como se describe más adelante, el estado del gen puede evaluarse mediante un ensayo funcional o puede inferirse de la naturaleza de las desviaciones detectadas de una secuencia de referencia.

- 45 En ciertas realizaciones, el estado de tipo salvaje o mutante del gen PIK3CA se determina por la presencia o ausencia de variaciones de ácido nucleico no sinónimas en los genes. Variaciones no sinónimas observadas que corresponden a polimorfismos comunes conocidos sin efectos funcionales anotados no contribuyen a un estado del gen de mutante.

- 50 Otras variaciones en el gen PIK3CA que significan estado mutante incluyen variaciones del sitio de empalme que disminuyen el reconocimiento de una unión de intrón/exón durante el procesamiento de pre-ARNm a ARNm. Esto puede resultar en un exón faltante o la inclusión de una secuencia normalmente intrónica en ARNm empalmado (retención de intrones o utilización de uniones de empalme crípticas). Esto puede resultar, a su vez, en la producción de proteína aberrante con inserciones y/o eliminaciones con respecto a la proteína normal. Por lo tanto, en otras realizaciones, el gen tiene un estado mutante si existe una variante que altera la secuencia de reconocimiento del sitio de empalme en una unión de intrón/exón.

- 55 Además, la medición del estado de mutación o estado de activación de genes adicionales, tales como Kras, un marcador potencial de resistencia en tumores con PIK3CA o PI3K- $\alpha$  aberrante o desregulado, podría ayudar a aumentar

la predictibilidad de un abordaje de medicina personalizada.

En una encuesta que realizamos en AstraZeneca sobre el cáncer de mama (en base a la base de datos COSMIC (Wellcome Trust Sanger Institute, Set. 2011), se identificaron >55 de mutaciones diferentes en el gen PIK3CA de un conjunto de datos que cubre >5K tumores humanos. La mayoría de las mutaciones ocurrieron con una frecuencia <1%, 3 ocurrieron con una frecuencia de 1-3%, pero 4 mutaciones constituyeron el ~88% de las mutaciones totales de PIK3CA. Estas fueron mutaciones de sentido erróneo del dominio de quinasa en el dominio de quinasa del extremo C terminal, H1047R (55%) y H1047L (5%), y los residuos del dominio helicoidal, E545K (18%) y E542K (11%). Una lista más larga de otras mutaciones de cáncer de mama prevalentes, aunque no pretenden ser exhaustiva, abarca R38H, R38C, R88Q, N345K, C420R, E453Q, P539R, E542K, E545K, E545A, Q546K, Q546P, M1043I, M1043V, H1047R, H1047L, H1047Y. Así, pueden construirse ensayos de diagnóstico que se centren en la detección de las mutaciones más comunes, permitiendo así la identificación de la mayoría de las mutaciones de PIK3CA. Por ejemplo la Prueba de mutación de PIK3CA Cobas (TM) de Roche Molecular Systems está diseñada para detectar 17 mutaciones en los exones 1, 4, 7, 9 y 20 del gen PIK3CA (E542K, E545A, E545G, E545K, E545D, Q546K, Q546R, Q546E, Q546L, N345K, C420R, R88Q, H1047L, H1047R, H1047Y, G1049R y M1043I) en ADN aislado de muestras tumorales embebidas en parafina fijadas en formalina. Este kit es capaz de detectar hasta ~95% de mutaciones en cáncer de mama ER+vo. La distribución de mutaciones difiere en otros tipos de tumores y la estrategia de diagnóstico puede adaptarse en consecuencia. Por ejemplo, en cáncer endometrial, existe una distribución más uniforme de las mutaciones propagadas en toda la secuencia codificante del gen PIK3CA y con un mayor número de mutaciones en la región del extremo N terminal de la proteína (comunicada por Douglas A. Levine, M.D, TCGA 2nd Annual Symposium, 28 de Noviembre de 2012), en comparación con cánceres de mama.

Para PIK3CA, las secuencias de referencia están disponibles para el gen (número de acceso GenBank: NG\_012113), ARNm (número de acceso GenBank: NM\_006218) y proteína (número de acceso GenBank: NP\_006209 o acceso de Swiss-Prot: P42336). Las secuencias del gen de referencia (región genómica) incluyen 5000 bases de secuencia corriente arriba y 2000 bases de secuencia corriente abajo. Las mutaciones en PIK3CA son bien conocidas (base de datos COSMIC - Wellcome Trust Sanger Institute) y el experto en la técnica será capaz de determinar el estado del gen PIK3CA, es decir, si un gen PIK3CA particular es de tipo salvaje o mutante, en base a la comparación de secuencia de ADN o proteica con tipo salvaje.

Será evidente que las secuencias génicas y de ARNm divulgadas para PIK3CA y la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la secuencia de proteína alfa quinasa PI3 son, cada una, una secuencia representativa. En individuos normales existen dos copias de cada gen, una copia materna y otra paterna, que tendrán probablemente algunas diferencias de secuencias; más aun, en una población existirán numerosas variantes alélicas de la secuencia génica. Otras secuencias consideradas como de tipo salvaje incluyen aquellas que poseen uno o más cambios sinónimos a la secuencia de ácido nucleico (cuyos cambios no alteran la secuencia proteica codificada), polimorfismos comunes no sinónimos (por ejemplo, polimorfismos de línea germinal) que alteran la secuencia proteica pero no afectan la función proteica y cambios de secuencia del sitio de no empalme intrínico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para determinar la probabilidad de la efectividad del tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) en un paciente humano afectado con cáncer que comprende: detectar la presencia o ausencia de al menos una diferencia de ácido nucleico no sinónima en el gen PIK3CA de dicho paciente con respecto al gen de tipo salvaje, en donde la presencia de al menos una diferencia de ácido nucleico no sinónima en el gen PIK3CA indica que el tratamiento con el compuesto de Fórmula (I) es probable que sea efectivo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un método para evaluar la susceptibilidad de un individuo al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I), comprendiendo dicho método:

- (i) determinar el estado de mutación no sinónima del gen PIK3CA en el ADN de células tumorales del individuo; y
- (ii) determinar la probable susceptibilidad del individuo al tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) con referencia a un estado de mutación no sinónima del gen PIK3CA en las células tumorales.

Existen numerosas técnicas disponibles para el experto en la técnica para determinar el estado del gen de PIK3CA. El estado del gen puede determinarse mediante la determinación de la secuencia de ácido nucleico. Esto podría realizarse mediante secuenciación directa del gen de longitud completa o análisis de sitios específicos dentro del gen, por ejemplo, sitios comúnmente mutados.

Un medio alternativo para determinar si el gen PIK3CA es de tipo salvaje o mutante es evaluar la función del gen transcrito. La mutación funcional de este gen PIK3CA produce una proteína que tiene mayor actividad de quinasa lipídica, lo que resulta en una mayor señalización corriente abajo de la vía en células, incluyendo, a modo no taxativo, la activación de Akt y quinasa S6. Los ensayos para evaluar el estado funcional de variantes de PIK3CA cuando se expresa en células incluyen, a modo no taxativo:

- (i) mayor producción del producto de la actividad de quinasa del gen PIK3CA, fosfatidilinositol-trisfosfato (PI(3,4,5)P3);
- (ii) mayores niveles de Akt o quinasa S6 fosforilada;

(iii) mayor locus y formación de colonias de células NIH-3T3 transfectadas con la variante de PIK3CA; (Ikenoue T et al., Cancer Res., 2005, 65, 4562-4567).

*Muestras*

5 La muestra del paciente a evaluar para el estado del gen puede ser cualquier tejido tumoral o muestra que contiene células tumorales obtenidas o que pueden obtenerse del individuo. La muestra de prueba es convenientemente una muestra de sangre, hisopo bucal, biopsia u otro fluido o tejido corporal obtenido de un individuo. Ejemplos particulares incluyen: células tumorales circulantes, ADN circulante en el plasma o suero, células aisladas del fluido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario, esputo pulmonar para pacientes con tumores en el pulmón, una biopsia aspirativa con aguja fina de un paciente con cáncer de mama, orina, sangre periférica, un raspado de células, un folículo de cabello, 10 una punción en la piel o una muestra bucal.

Se apreciará que la muestra de prueba puede ser igualmente una secuencia de ácido nucleico que corresponde a la secuencia en la muestra de prueba, es decir que toda o parte de la región en el ácido nucleico de la muestra puede en primer lugar amplificarse utilizando cualquier técnica conveniente, por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa (PCR), antes del análisis. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN de célula fraccionada o completa. En 15 realizaciones particulares, el ARN es ARN de célula completa y se utiliza directamente como la plantilla para etiquetar una primera hebra de ADNc utilizando cebadores aleatorios o cebadores poli A. El ácido nucleico o proteína en la muestra de prueba puede extraerse de la muestra de acuerdo con metodologías estándar (ver Green & Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4ª edición, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

20 Los métodos de diagnóstico de la invención pueden realizarse utilizando una muestra previamente tomada del individuo o paciente. Dichas muestras pueden conservarse mediante el congelado o fijarse y embeberse en formalina-parafina u otro medio. Alternativamente, puede obtenerse y utilizarse una muestra que contiene una célula tumoral fresca.

Los métodos de la invención pueden aplicarse utilizando células de cualquier tumor. Tumores adecuados para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) se han descrito anteriormente en la presente.

25 Las mutaciones en PIK3CA se encuentran en general en tumores clínicos, pero la prevalencia de mutaciones en cada gen varía significativamente según el tipo de tejido tumoral. Por ejemplo, las mutaciones de PIK3CA son relativamente comunes en el cáncer de mama pero relativamente raras en tumores de riñón.

Tabla 1.

Tejido	Prevalencia de mutación de PIK3CA (%)
Pene	29
Endometrio	26
Mama	26
Intestino delgado	20
Tracto urinario	17
Piel	13
Intestino grueso	12
Estómago	9
Tracto biliar	9
Ovario	9
Cuello de útero	8
Esófago	6
Hígado	6
Tracto aerodigestivo superior	6
SNC	5
Piel normal	5
Pulmón	4
Tiroides	4
Pituitaria	3
Tejido blando	3

Páncreas	3
Riñón	2
Próstata	2
Meninges	1
Ojo	1
Ganglios autonómicos	1
Hematopoyético/linfoide	1
Glándula suprarrenal	0
Huesos	0
Trompa de Falopio	0
Tractor gastrointestinal (sitio indeterminado)	0
Peritoneo	0
Glándula salival	0
Testículos	0
Timo	0
Vagina	0

Tabla 1: Prevalencia de mutaciones de PIK3CA en muestras clínicas. La fuente para la información de PIK3CA es la base de datos COSMIC (publicación v62). Los métodos de selección de pacientes de la invención pueden ser particularmente útiles en los segmentos de enfermedad (tejido) donde existe una alta incidencia de mutaciones de PIK3CA (por ejemplo, mama, tracto urinario, endometrio, intestino grueso, cuello de útero, etc.).

5 Como será evidente para cualquier experto en la técnica, estos datos de frecuencia están continuamente siendo refinados y actualizados mientras datos nuevos y más exhaustivos emergen de consorcios de perfilado del Genoma de Cáncer Humano tales como TCGA (The Cancer Genome Atlas) e ICGC (International Cancer Genome Consortium). Por lo tanto, tipos de tumores adicionales con dependencia de PIK3CA pueden identificarse y reunir los requisitos para el tratamiento con los compuestos descritos en la presente.

10 *Métodos para la detección de ácidos nucleicos*

La detección de ácidos nucleicos de PIK3CA mutantes puede emplearse, en el contexto de la presente invención, para predecir la respuesta al tratamiento con fármacos. Dado que las mutaciones en estos genes ocurren a nivel del ADN, los métodos de la invención pueden basarse en la detección de mutaciones o diferencias en ADN genómico, así como transcritos y proteínas en sí. Puede ser deseable confirmar las mutaciones en ADN genómico mediante análisis de transcritos y/o polipéptidos para asegurar que la mutación detectada se exprese, en efecto, en el sujeto.

20 Será evidente para el experto en la técnica que existe un gran número de procedimientos analíticos que pueden utilizarse para detectar la presencia o ausencia de nucleótidos variantes en una o más posiciones en un gen. En general, la detección de una variación alélica requiere una técnica de discriminación de mutaciones, opcionalmente una reacción por amplificación (tal como una en base a una reacción en cadena de polimerasa) y opcionalmente un sistema de generación de señales. Existe una multitud de técnicas de detección de mutaciones disponibles en la técnica y estas pueden utilizarse en combinación con un sistema de generación de señales del cual hay numerosos disponibles en la técnica. Muchos métodos para la detección de variaciones alélicas son reseñados por Nollau et al., *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1114-1120; Anderson SM. *Expert Rev Mol Diagn.*, 2011, 11, 635-642; Meyerson M. et al., *Nat Rev Genet.*, 2010, 11, 685-696; y en libros de texto estándar, por ejemplo, "*Laboratory Protocols for Mutation Detection*", Ed. por U. Landegren, Oxford University Press, 1996 y "PCR", 2<sup>da</sup> Edición por Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

30 Como se estableció anteriormente, la determinación de la presencia o ausencia de una diferencia o pluralidad particular en el gen PIK3CA en un paciente con cáncer puede realizarse de varias maneras. Dichas pruebas se realizan comúnmente utilizando ADN o ARN recogido de las muestras biológicas, por ejemplo, biopsias de tejido, orina, deposición, esputo, sangre, células, raspados de tejido, biopsia aspirativa de mama u otros materiales celulares y pueden realizarse mediante una variedad de métodos, incluyendo, a modo no taxativo, PCR, hibridación con sondas específicas de alelos, detección de mutación enzimática, escisión química de no coincidencias, espectrometría de masas o secuenciación de ADN, incluyendo minisequenciación.

35 Las técnicas de detección de mutaciones adecuadas incluyen las técnicas de sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMST<sup>TM</sup>), extensión lineal del sistema de mutación refractario a la amplificación (ALEX<sup>TM</sup>), sistema de cebado de oligonucleótidos competitivos (COPS), Taqman, balizas moleculares, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y sitio de restricción en base a PCR y transferencia de energía por resonancia fluorescente

(FRET).

5 En realizaciones particulares, el método empleado para determinar el nucleótido en un gen biomarcador se selecciona de: amplificación específica de alelos (PCR específica de alelos) - tal como sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS), secuenciación, ensayo de discriminación alélica, hibridación, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) o ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA).

10 En realizaciones particulares, la hibridación con sondas específicas de alelos puede llevarse a cabo mediante: (1) oligonucleótidos específicos de alelos unidos a una fase sólida (por ejemplo membranas de vidrio, silicio, nylon) con la muestra etiquetada en solución, por ejemplo como en muchas aplicaciones con chips de ADN o (2) muestra unida (a menudo ADN clonado o ADN amplificado por PCR) y oligonucleótidos etiquetados en solución (ya sea específicos de alelos o cortos para permitir la secuenciación mediante hibridación). Las pruebas de diagnóstico pueden implicar un panel de diferencias, a menudo en un soporte sólido, que permite la determinación simultánea de más de una diferencia. Dichas sondas de hibridación son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4ª edición, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y pueden abarcar dos o más sitios de diferencia.

15 Por lo tanto, en una realización, se proporciona la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación para poner en contacto ácido nucleico de PIK3CA que contiene un sitio de mutación putativa con al menos una sonda de ácido nucleico. La sonda preferentemente se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que incluye un sitio de diferencia y que contiene bases de nucleótidos complementarias en el sitio de diferencia en condiciones de hibridación selectiva. La hibridación puede detectarse con una etiqueta detectable utilizando etiquetas conocidas para un experto en la técnica. Dichas etiquetas incluyen, a modo no taxativo, etiquetas radioactivas, fluorescentes, de tintes y enzimáticas.

20 En otra realización se proporciona la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación para poner en contacto ácido nucleico de PIK3CA que contiene un sitio de mutación putativa con al menos un cebador de ácido nucleico. El cebador preferentemente se hibrida con una secuencia de ácido nucleico que incluye un sitio de diferencia y que contiene bases de nucleótidos complementarias en el sitio de diferencia en condiciones de hibridación selectiva.

30 Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificación específica pueden portar la base de nucleótidos complementaria a la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial; ver, por ejemplo, Gibbs, et al., 1989. Nucl. Acids Res., 17, 2437-248) o en el extremo 3'-terminal de un cebador donde, en condiciones apropiadas, la no coincidencia puede prevenir o reducir la extensión de la polimerasa (ver, por ejemplo, Prossner, 1993, Tibtech, 11 238).

En otra realización adicional, la detección de la presencia o ausencia de al menos una mutación comprende secuenciar al menos una secuencia de ácido nucleico y comparar la secuencia obtenida con la secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje.

35 Alternativamente, la presencia o ausencia de al menos una mutación comprende la determinación espectrométrica de la masa de al menos una secuencia de ácido nucleico.

40 En una realización, la detección de la presencia o ausencia de al menos una diferencia de ácido nucleico comprende realizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se amplifica la secuencia de ácido nucleico objetivo que contiene la diferencia hipotética y se determina la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado. Determinar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico amplificado comprende secuenciar al menos un segmento de ácido nucleico. Alternativamente, los productos de amplificación pueden analizarse utilizando cualquier método capaz de separar los productos de amplificación de acuerdo con su tamaño, incluyendo electroforesis con gel automatizada y manual, y similares.

45 Las mutaciones en el ácido nucleico genómico se detectan de manera ventajosa mediante técnicas en base a cambios de movilidad en fragmentos de ácido nucleico amplificados. Por ejemplo, Chen et al., Anal Biochem 1996, 239, 61-9, describe la detección de mutaciones de una sola base mediante un ensayo de cambio de movilidad competitiva. Más aún, los ensayos en base a la técnica de Marcelino et al., BioTechniques 1999, 26, 1134-1148 están disponibles comercialmente.

50 En un ejemplo particular puede utilizarse el análisis de heterodúplex capilar para detectar la presencia de mutaciones en base a un cambio de movilidad de ácidos nucleicos dúplex en sistemas capilares como resultado de la presencia de no coincidencias.

55 La generación de ácidos nucleicos para análisis a partir de muestras generalmente requiere amplificación de ácido nucleico. Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción en cadena enzimática (tal como una reacción en cadena de polimerasa, una reacción en cadena de ligasa o una replicación de secuencia auto-sostenida) o en la replicación de todo o parte del vector en el cual se ha clonado. Preferiblemente, la amplificación de acuerdo con la invención es una amplificación exponencial, como se exhibió, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de polimerasa.

Muchos métodos de amplificación de señales y objetivos se han descrito en la literatura, por ejemplo, reseñas generales de estos métodos en Landegren, U., et al., Science, 1988 242, 229-237 y Lewis, R., Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55. Estos métodos de amplificación pueden utilizarse en los métodos de nuestra invención e incluyen reacción en cadena de polimerasa (PCR), PCR in situ, reacción de amplificación de ligasa (LAR), hibridación de ligasa, replicasa del bacteriófago Q $\beta$ , sistema de amplificación en base a transcripción (TAS), amplificación genómica con secuenciación de transcripto (GAWTS), amplificación en base a una secuencia de ácido nucleico (NASBA) e hibridación in situ. Cebadores adecuados para su uso en varias técnicas de amplificación pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un método de amplificación de ácido nucleico descrito, entre otras, en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195 y 4,683,202. La PCR consiste en ciclos repetidos de reacciones de extensión de cebadores generadas por polimerasa de ADN. El ADN objetivo se desnaturaliza con calor y dos oligonucleótidos, que agrupan la secuencia objetivo en hebras opuestas del ADN a amplificar, se hibridan. Estos oligonucleótidos se vuelven cebadores para su uso con polimerasa de ADN. El ADN se copia por extensión del cebador para realizar una segunda copia de ambas hebras. Mediante la repetición del ciclo de desnaturalización por calor, la hibridación y extensión del cebador, el ADN objetivo puede amplificarse un millón de veces o más en aproximadamente dos a cuatro horas. La PCR es una herramienta de biología molecular que debe utilizarse en conjunto con una técnica de detección para determinar los resultados de la amplificación. Una ventaja de la PCR es que aumenta la sensibilidad mediante la amplificación de la cantidad de ADN objetivo de 1 millón a 1,000 millones de veces en aproximadamente 4 horas. La PCR puede utilizarse para amplificar cualquier ácido nucleico conocido en un contexto de diagnóstico (Mok et al., Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252).

Una técnica de amplificación específica de alelos, tal como Sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS™) (Newton et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2503-2516), también puede utilizarse para detectar mutaciones de una sola base. En las condiciones de amplificación de PCR apropiadas, una no coincidencia de una sola base ubicada en el extremo 3' del cebador es suficiente para la amplificación preferencial del alelo perfectamente apareado (Newton et al., 1989, *supra*), permitiendo la discriminación de especies estrechamente relacionadas. La base de un sistema de amplificación utilizando los cebadores descritos anteriormente es que los oligonucleótidos con un residuo 3' no coincidente no funcionarán como cebadores en la PCR en condiciones apropiadas. Este sistema de amplificación permite el genotipado únicamente mediante la inspección de mezclas de reacción después de la electroforesis con gel de agarosa.

El análisis de los productos de amplificación puede realizarse utilizando cualquier método capaz de separar los productos de amplificación de acuerdo con su tamaño, incluyendo electroforesis con gel automatizada y manual, espectrometría de masas y similares.

Los métodos de aislamiento, amplificación y análisis de ácido nucleico son de rutina para un experto en la técnica y ejemplos de protocolos pueden encontrarse, por ejemplo, en Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4ª edición, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Una fuente de protocolo particularmente útil para métodos utilizados en la amplificación de PCR es PCR (Basics: From Background to Bench) de M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1ª edición (15 de octubre de 2000), ISBN: 0387916008.

La presente invención también proporciona kits predictivos y de diagnóstico que comprenden cebadores degenerados para amplificar un ácido nucleico objetivo en el gen PIK3CA e instrucciones que comprenden el protocolo de amplificación y análisis de los resultados. El kit también puede comprender alternativamente soluciones amortiguadoras, enzimas y recipientes para realizar la amplificación y análisis de los productos de amplificación. El kit también puede ser un componente de un estudio, o kit diagnóstico que comprende otras herramientas tales como microensayos de ADN u otros soportes. Preferiblemente, el kit también proporciona una o más plantillas testigo, tales como ácidos nucleicos aislados de muestra de tejido normal y/o una serie de muestras que representan diferentes diferencias en los genes de referencia.

En una realización, el kit proporciona dos o más pares de cebadores, siendo cada par capaz de amplificar una región diferente del gen de referencia (PIK3CA) (cada región un sitio de diferencia potencial) proporcionando así un kit para análisis de expresión de diversas diferencias de genes en una muestra biológica en una reacción o varias reacciones paralelas.

Los cebadores en los kits pueden etiquetarse, por ejemplo, etiquetarse fluorescentemente, para facilitar la detección de los productos de amplificación y análisis consecuente de las diferencias de ácido nucleico. El kit también puede permitir más de una diferencia a detectar en un análisis. Un kit de combinación comprenderá, por lo tanto, cebadores capaces de amplificar diferentes segmentos del gen de referencia. Los cebadores pueden etiquetarse diferencialmente, por ejemplo, utilizando diferentes etiquetas fluorescentes, a modo de diferenciar entre las diferencias.

También se divulgan usos de kits para la detección de mutaciones de PIK3CA incluyendo, a modo no taxativo, los kits de detección de mutación de PIK3CA comercializados por compañías de diagnóstico, tales como Qiagen y Roche Molecular Systems.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un paciente que sufre de cáncer que comprende: determinar el estado mutante o de tipo salvaje del gen PIK3CA en las células tumorales del paciente y, si el gen PIK3CA es mutante, administrar al paciente una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula (I).

5 Tal como se utiliza en la presente, los términos "efectivo" y "efectividad" incluyen tanto efectividad farmacológica como seguridad fisiológica. La efectividad farmacológica se refiere a la capacidad del tratamiento de resultar en un efecto biológico deseado en el paciente. La seguridad fisiológica se refiere al nivel de toxicidad u otros efectos fisiológicos adversos a nivel celular, de órganos y/u organismo (a menudo denominados efectos secundarios) que resultan de la administración del tratamiento. "Menos efectivo" significa que el tratamiento resulta en un nivel terapéuticamente significativo más bajo de efectividad farmacológica y/o un nivel terapéuticamente más alto de efectos fisiológicos adversos.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (I) para tratar a un paciente con cáncer cuyas células tumorales se han identificado por poseer un gen PIK3CA mutante.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se proporciona un compuesto de Fórmula (I) para tratar cánceres con células tumorales identificadas por albergar el gen PIK3CA mutante.

15 En otras realizaciones adicionales, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I) para su uso en la prevención y el tratamiento de cáncer con células tumorales identificadas por albergar un gen PIK3CA mutante.

Para todos los aspectos anteriores, las formas mutantes de PIK3CA determinadas/identificadas se encuentran en todas las posiciones en todo el gen.

20 Para todos los aspectos anteriores, en los que se utilizan tumores tales como cáncer de mama como un ejemplo, formas mutantes particulares de PIK3CA determinadas/identificadas son aquellas en las posiciones R38, R88, N345, C420, E453, P539, E542K, E545K, Q546, M1043, M1043 y H1047R.

25 Para todos los aspectos anteriores, en los que se utilizan tumores tales como cáncer de mama como un ejemplo, formas mutantes particulares de PIK3CA determinadas/identificadas son aquellas en las posiciones E542, E545 y H1047.

#### Ejemplos de atención médica personalizada/medicina personalizada

##### Ensayo de proliferación celular en líneas de células tumorales

La sensibilidad de un panel de líneas celulares de cáncer humano a los efectos de los compuestos se determinó en un ensayo de proliferación estándar. Los detalles del protocolo de ensayo se capturan en ensayos biológicos (g) anteriores.

#### 30 Análisis de correlación de mutaciones

##### Métodos

Los datos farmacológicos que miden la inhibición del crecimiento celular en respuesta al tratamiento con el Ejemplo 3 se obtuvieron para un conjunto de 209 líneas de células cancerosas a partir de una variedad de tejidos y de múltiples fuentes. Cada línea celular se clasificó como sensible ( $GI_{50} \leq 1.0 \mu M$ ) o resistente ( $GI_{50} > 1.0 \mu M$ ).

35 El estado de mutación para genes en cada línea celular se obtuvo mediante la integración de resultados de fuentes internas (AstraZeneca) y públicas. Los datos públicos incluyeron todos los datos de líneas celulares del Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project, publicación 3 (Garnett MJ, et al. *Nature*, 2012, Mar 483, 570-5), el proyecto Cancer Cell Line Encyclopedia (Barretina J, et al., *Nature* 2012, 483, 603-7) y la base de datos del Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) (publicación v61; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>); Forbes SA, et al. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39 (edición de base de datos):D945-50; Forbes SA, et al., *Curr Protoc Hum Genet*. 2008; Capítulo 10: Unidad 10.11.) y artículos científicos seleccionados. Las mutaciones de región de codificación silenciosa (variantes sinónimas) y polimorfismos no sinónimos se excluyeron, y, a los efectos de este análisis, se ignoró la cigosidad de las mutaciones. Para cada combinación de línea celular y gen, el estado se resumió como mutante (MUT), de tipo salvaje (WT) o incoherente (INCON). Algunos casos inicialmente incoherentes (observaciones WT y MUT independientes para el mismo gen en la misma línea celular) se resolvieron mediante la ponderación de observaciones internas y aquellas para el subconjunto del Cancer Cell Line Project (CCLP) de COSMIC o mediante la selección de un estado después de la revisión manual. En casos donde las observaciones incoherentes no podían resolverse, la etiqueta INCON se retuvo y el estado del gen se consideró como desconocido durante el análisis.

50 Las asociaciones entre el estado y la respuesta de la mutación se identificaron mediante la construcción de tablas de contingencia para cada gen y la determinación de índices de probabilidad correspondientes y valores P de prueba exactos de Fisher de dos colas. Las líneas celulares clasificadas como marginales para respuesta se excluyeron del análisis inicial para identificar los biomarcadores candidatos. Para el estado de la mutación, se contaron los hallazgos MUT o WT y también se excluyeron los genes con líneas celulares con menos de 4 WT o 4 MUT.



Resultados y análisis

Las asociaciones entre el estado y la respuesta de la mutación se identificaron como se describió en Métodos. La respuesta de la línea celular al Ejemplo 3 y el estado genético correspondiente para el gen PIK3CA se muestran en la Tabla 3.

- 5 Tabla 3. Los datos farmacológicos, clasificación de respuesta y el estado de mutación del gen PIK3CA para las líneas celulares utilizadas en este estudio.

Línea Celular	Categoría	Tejido	GI50 $\mu$ M	PIK3CA
RS411	Sensible	Sangre/linfa	9.03E-02	WT
T47D	Sensible	Mama	0.1982	MUT
H596	Sensible	Pulmón	0.3018	MUT
MCF7	Sensible	Mama	0.3094	MUT
MV411	Sensible	Sangre/linfa	0.3816	WT
HRA19	Sensible	Recto	0.3926	MUT
IM95M	Sensible	Estómago	0.4359	MUT
MDAMB453	Sensible	Mama	0.4564	MUT
JEKO1	Sensible	Sangre/linfa	0.4994	WT
SNU601	Sensible	Estómago	0.5063	MUT
HCC1187	Sensible	Mama	0.5088	WT
SW48	Sensible	Colon	0.5131	MUT
H1703	Sensible	Pulmón	0.5144	WT
THP1	Sensible	Sangre/linfa	0.5281	WT
LK2	Sensible	Pulmón	0.5884	WT
HUPT4	Sensible	Páncreas	0.6408	WT
L363	Sensible	Sangre/linfa	0.6812	MUT
TCCSUP	Sensible	Vejiga	0.7237	MUT
VMCUB1	Sensible	Vejiga	0.7319	MUT
RERFLCSQ1	Sensible	Pulmón	0.7711	MUT
HCC1419	Sensible	Mama	0.7799	WT
LNCAPCASRES	Sensible	Próstata	0.7924	WT
CCK81	Sensible	Colon	0.8031	MUT
HCC1954	Sensible	Mama	0.8794	MUT
SW948	Sensible	Colon	0.9111	MUT
PANC0203	Sensible	Páncreas	0.9628	WT
BFTC905	Sensible	Vejiga	0.9662	WT
REH	Resistente	Sangre/linfa	1.047	WT
SNU216	Resistente	Estómago	1.072	WT
SKCO1	Resistente	Colon	1.128	WT
SUM52PE	Resistente	Mama	1.145	WT
RT11284	Resistente	Vejiga	1.171	WT
OVCAR3	Resistente	Ovario	1.179	WT
MOLM13	Resistente	Sangre/linfa	1.22	WT
C99	Resistente	Colon	1.224	WT
CALU3	Resistente	Pulmón	1.296	WT
N87	Resistente	Estómago	1.301	WT

ES 2 608 395 T3

2313287	Resistente	Estómago	1.339	WT
PAMC82	Resistente	Estómago	1.366	WT
HCC1569	Resistente	Mama	1.369	WT
AGS	Resistente	Estómago	1.414	MUT
JIMT1	Resistente	Mama	1.46	MUT
HGC27	Resistente	Estómago	1.501	MUT
MKN1	Resistente	Estómago	1.579	MUT
SKBR3	Resistente	Mama	1.588	WT
SNU368	Resistente	Hígado	1.597	WT
PANC89	Resistente	Páncreas	1.618	WT
ASPC1	Resistente	Páncreas	1.74	WT
SNU484	Resistente	Estómago	1.785	WT
H2085	Resistente	Pulmón	1.835	WT
HARA	Resistente	Pulmón	1.906	WT
AZ521	Resistente	Duodeno	2.063	WT
HPAC	Resistente	Páncreas	2.162	WT
NOMO1	Resistente	Sangre/linfa	2.167	WT
PNT1A	Resistente	Próstata	2.17	WT
H1975	Resistente	Pulmón	2.262	MUT
OCUM1	Resistente	Estómago	2.332	WT
BT20	Resistente	Mama	2.36	MUT
HCT8	Resistente	Colon	2.51	MUT
COLO320DM	Resistente	Colon	2.512	WT
PANC1005	Resistente	Páncreas	2.607	WT
SW403	Resistente	Colon	2.61	MUT
MONOMAC6	Resistente	Sangre/linfa	2.622	WT
HPAFII	Resistente	Páncreas	2.63	WT
HT1197	Resistente	Vejiga	2.8	MUT
LNCAPCLONEFGC	Resistente	Próstata	3.007	WT
HCC95	Resistente	Pulmón	3.107	WT
SNU620	Resistente	Estómago	3.144	WT
MOLP8	Resistente	Sangre/linfa	3.289	WT
H2291	Resistente	Pulmón	3.291	WT
DMS114	Resistente	Pulmón	3.294	WT
MHCC97L	Resistente	Hígado	3.353	WT
CFPAC1	Resistente	Páncreas	3.384	WT
HS766T	Resistente	Páncreas	3.467	WT
ZR751	Resistente	Mama	3.558	WT
PC3	Resistente	Próstata	3.833	WT
22RV1	Resistente	Próstata	4.144	MUT
RKO	Resistente	Colon	4.323	MUT
977	Resistente	Vejiga	4.42	WT
MOLM16	Resistente	Sangre/linfa	4.601	WT
H358	Resistente	Pulmón	4.642	WT

ES 2 608 395 T3

LUDLU1	Resistente	Pulmón	4.646	WT
QGP1	Resistente	Páncreas	4.865	WT
OE19	Resistente	Esófago	5.129	WT
SW1710	Resistente	Vejiga	5.339	WT
PANC1	Resistente	Páncreas	5.344	WT
SNU449	Resistente	Hígado	5.41	WT
647V	Resistente	Vejiga	5.464	WT
HT29	Resistente	Colon	5.483	MUT
SNU354	Resistente	Hígado	5.604	WT
HS746T	Resistente	Estómago	5.978	WT
H1869	Resistente	Pulmón	6.044	WT
UMUC3	Resistente	Vejiga	6.217	WT
PANC0403	Resistente	Páncreas	6.468	WT
KG1	Resistente	Sangre/linfa	6.588	WT
H520	Resistente	Pulmón	6.619	WT
HEP3B	Resistente	Hígado	6.687	WT
HCT15	Resistente	Colon	7.268	MUT
H1793	Resistente	Pulmón	7.329	WT
U937	Resistente	Sangre/linfa	7.345	WT
H2170	Resistente	Pulmón	7.644	WT
PANC0327	Resistente	Páncreas	8.025	WT
BEL7405	Resistente	Hígado	8.11	WT
HT1376	Resistente	Vejiga	8.199	WT
SNU638	Resistente	Estómago	8.221	WT
H322	Resistente	Pulmón	8.227	WT
DU145	Resistente	Próstata	8.239	WT
EBC1	Resistente	Pulmón	8.566	WT
JURKAT	Resistente	Sangre/linfa	8.691	WT
COLO205	Resistente	Colon	8.934	WT
RT4	Resistente	Vejiga	8.936	WT
KATOIII	Resistente	Estómago	9.155	WT
MDAMB468	Resistente	Mama	9.325	WT
5637	Resistente	Vejiga	9.627	WT
OE33	Resistente	Esófago	9.856	WT
LS180	Resistente	Colon	9.942	MUT
HCCC9810	Resistente	Ducto biliar	10.02	WT
H226	Resistente	Pulmón	10.1	WT
A549	Resistente	Pulmón	10.15	WT
QGY7703	Resistente	Hígado	11.07	WT
H647	Resistente	Pulmón	11.34	WT
MGHU3	Resistente	Vejiga	11.5	WT
H23	Resistente	Pulmón	12.3	WT
SCABER	Resistente	Vejiga	12.4	WT
H2126	Resistente	Pulmón	12.91	WT

ES 2 608 395 T3

HUPT3	Resistente	Páncreas	13.39	WT
SW620	Resistente	Colon	13.4	WT
CAPAN2	Resistente	Páncreas	13.42	WT
J82	Resistente	Vejiga	13.42	MUT
HLE	Resistente	Hígado	13.47	WT
BXPC3	Resistente	Páncreas	14.08	WT
MCF7MDR+	Resistente	Mama	14.45	WT
BEL7404	Resistente	Hígado	14.9	WT
SNU1	Resistente	Estómago	14.97	WT
KP4	Resistente	Páncreas	15.05	WT
CAMA1	Resistente	Mama	15.47	WT
HCA7	Resistente	Colon	15.49	WT
SNU668	Resistente	Estómago	15.51	WT
H522	Resistente	Pulmón	15.55	WT
SNU886	Resistente	Hígado	15.6	WT
SW480	Resistente	Colon	15.9	WT
HUH7	Resistente	Hígado	15.97	WT
CALU1	Resistente	Pulmón	16.03	WT
SNU878	Resistente	Hígado	16.06	WT
HCC1806	Resistente	Mama	16.71	WT
SNU16	Resistente	Estómago	16.76	WT
GTL16	Resistente	Estómago	17.38	WT
BT549	Resistente	Mama	17.44	WT
NAMALWA	Resistente	Sangre/linfa	17.55	WT
WSUDLCL2	Resistente	Sangre/linfa	17.71	WT
SU8686	Resistente	Páncreas	17.97	WT
H460DNP53	Resistente	Pulmón	17.98	WT
SNU761	Resistente	Hígado	18.49	WT
LOVO	Resistente	Colon	18.64	WT
SW780	Resistente	Vejiga	19.23	WT
SKMES1	Resistente	Pulmón	19.54	WT
H2286	Resistente	Pulmón	20.03	WT
SNU5	Resistente	Estómago	21.19	WT
HCC1395	Resistente	Mama	21.81	WT
HUH1	Resistente	Hígado	22.34	WT
MDAMB231	Resistente	Mama	23.61	WT
NUGC3	Resistente	Estómago	24.15	WT
MIAPACA2	Resistente	Páncreas	24.2	WT
SNU739	Resistente	Hígado	25.91	WT
CALU6	Resistente	Pulmón	26.15	WT
AMO1	Resistente	Sangre/linfa	26.93	WT
SW1990	Resistente	Páncreas	28.28	WT
CMK	Resistente	Sangre/linfa	28.91	WT
1A6	Resistente	Vejiga	30	WT

ES 2 608 395 T3

A2058	Resistente	Piel	30	WT
ARH77	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
CAPAN1	Resistente	Páncreas	30	WT
CC20	Resistente	Colon	30	WT
H1299	Resistente	Pulmón	30	WT
H1437	Resistente	Pulmón	30	WT
H460	Resistente	Pulmón	30	MUT
H526	Resistente	Pulmón	30	WT
H838	Resistente	Pulmón	30	WT
HCC15	Resistente	Pulmón	30	WT
HCC1937	Resistente	Mama	30	WT
HCT116	Resistente	Colon	30	MUT
HEL9217	Resistente	Sangre/linfa	30	INCON
HEPG2	Resistente	Hígado	30	WT
HLF	Resistente	Hígado	30	WT
HX147	Resistente	Pulmón	30	WT
IM9	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
JJN3	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
JVM3	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
K562	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
KU1919	Resistente	Vejiga	30	WT
MDAMB157	Resistente	Mama	30	WT
MDAMB436	Resistente	Mama	30	WT
MEC1	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
MKN74	Resistente	Estómago	30	WT
NUGC4	Resistente	Estómago	30	WT
OCIAML2	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
OCILY19	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
PC9	Resistente	Pulmón	30	WT
RAJI	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
RAMOS	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
RERFLCAI	Resistente	Pulmón	30	WT
RPMI8226	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
SC1	Resistente	Sangre/linfa	30	WT
SKHEP1	Resistente	Hígado	30	WT
SMMC7721	Resistente	Hígado	30	WT
SNU398	Resistente	Hígado	30	WT
SW900	Resistente	Pulmón	30	WT
T24	Resistente	Vejiga	30	WT
YAPC	Resistente	Páncreas	30	WT

El gen para el cual las mutaciones se correlacionaron más fuertemente con sensibilidad al Ejemplo 3 fue PIK3CA. Sólo 12 de las 177 líneas celulares WT de PIK3CA (7.7%) fueron sensibles al Ejemplo 3, mientras que 15 de 32 líneas celulares (46.9%) que son mutantes para PIK3CA fueron sensibles, que corresponden a índices de probabilidad de 12.1 y un valor p de  $1.2 \times 10^{-7}$  (ver Tabla 4).

Estado de mutación (PIK3CA)	Respuesta		Índice de probabilidad: 12.1
	Sensible	Resistente	
MUT	15	17	Valor p: 1.2x10 <sup>-7</sup>
WT	12	165	

Tabla 4. Tabla de contingencia para el estado de mutación de PIK3CA y respuesta al Ejemplo 3.

Como se indicó en la presente, se ha informado que la medición del estado de mutación o estado de activación de genes adicionales, tales como KRAS, un marcador potencial de resistencia en tumores con PIK3CA aberrante o desregulado o PI3K- $\alpha$ , podría ayudar a aumentar la predictibilidad de un abordaje de medicina personalizada.

- 5 Ejemplificamos esto para el conjunto de datos anterior mediante la comparación del enriquecimiento de mutaciones KRAS en células mutantes de PIK3CA con la respuesta de la línea celular a la inhibición. El análisis se limitó a líneas celulares que contenían mutaciones "críticas" de los dos genes (en los codones E542, E545 y H1047 para PIK3CA y en los codones K12, 13 y Q61 para KRAS). Esto demostró que en las líneas celulares mutantes de PIK3CA, las mutaciones en KRAS confirieron resistencia a la inhibición por el Ejemplo 3.
- 10 - Veintiocho líneas celulares contenían mutaciones activantes en PIK3CA.
- 6 de 19 líneas celulares (31.6%) que contenían una mutación de PIK3CA activante y un gen KRAS de tipo salvaje fueron resistentes al Ejemplo 3.
- 7 de 9 líneas celulares mutantes de PIK3CA (77.8%) contenían mutaciones KRAS coexistentes y fueron resistentes al Ejemplo 3.
- 15 Esto se traduce en un índice de probabilidad de 7.5 y un valor p de 0.042 (ver Tabla 5).

Estado de mutación	Respuesta		Índice de probabilidad: 7.5
	Sensible	Resistente	
KRAS Y PIK3CA MUT	2	7	Valor p: 0.042
PIK3CA MUT y KRAS WT	13	6	

Tabla 5. Tabla de contingencia para el estado de mutación de PIK3CA y KRAS y respuesta al Ejemplo 3.

Ejemplos

La invención se ilustrará ahora mediante los siguientes Ejemplos en los que, en general:

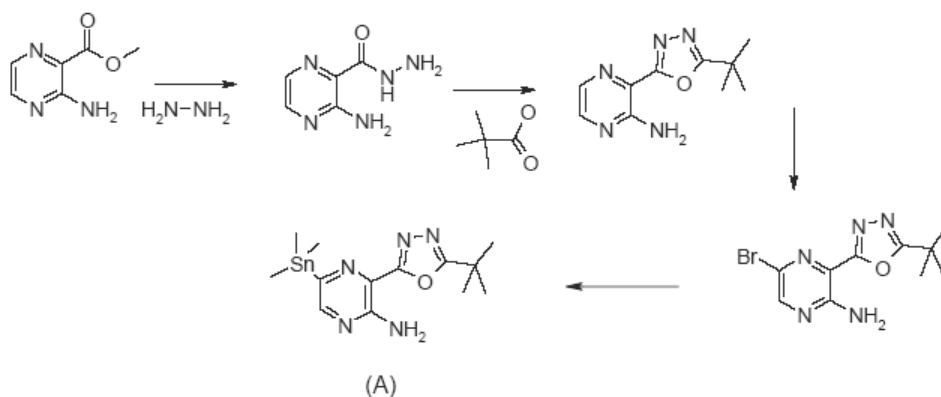
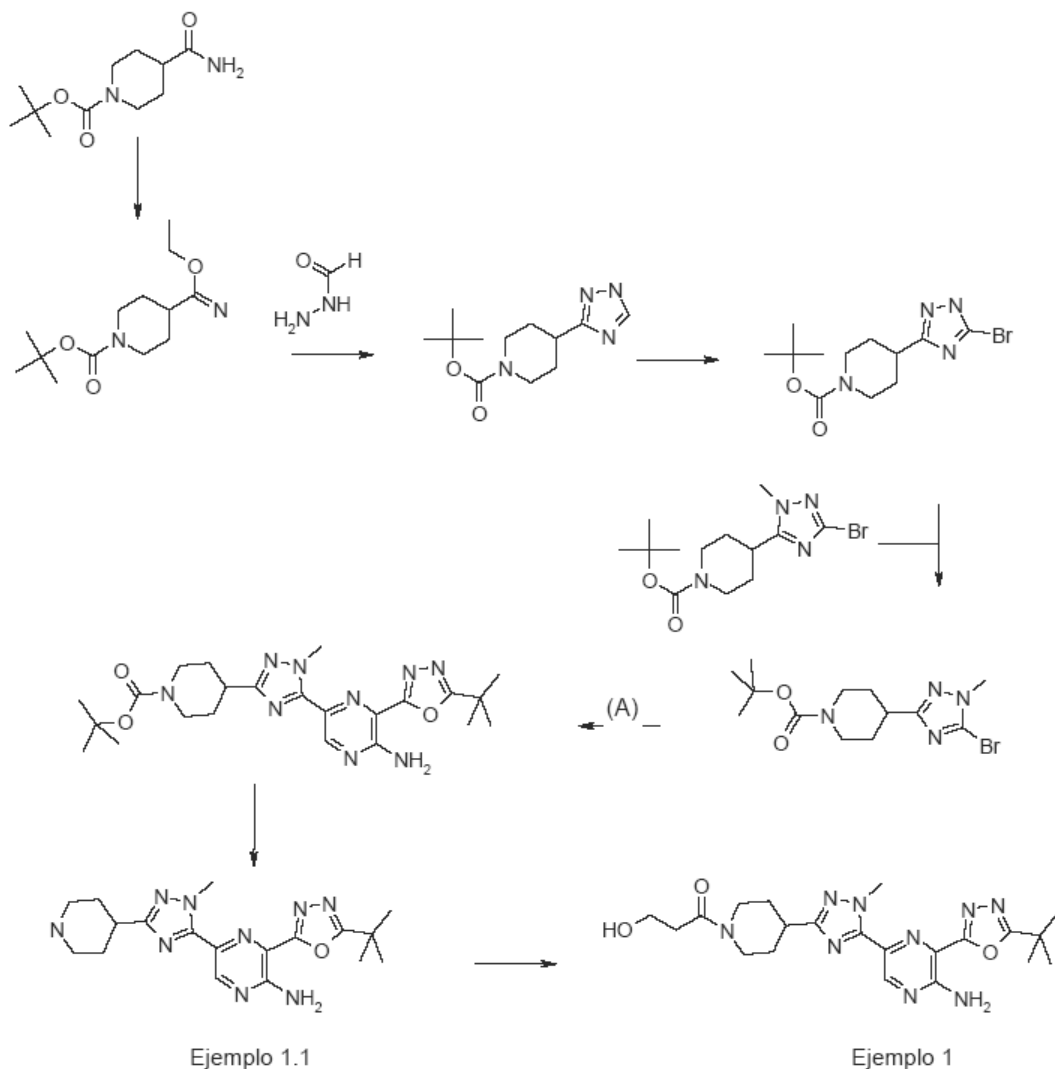
- 20 (i) las operaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente, es decir, a una temperatura en el rango de 17 a 25°C y en una atmósfera de un gas inerte, tal como nitrógeno, a menos que se indique de otra forma;
- (ii) las evaporaciones se llevaron a cabo mediante evaporación por rotación o utilizando un equipo Genevac al vacío y los procedimientos de elaboración se llevaron a cabo luego de la eliminación de los residuos sólidos mediante filtración;
- 25 (iii) las purificaciones de cromatografía instantánea se realizaron en un Armen Glider Flash : Spot II Ultimate (Armen Instrument, Saint-Ave, Francia) automatizado utilizando cartuchos de sílice Si60 de fase normal Merck precargados (granulometría : 15-40 o 40-63µm) obtenidos de Merck, Darmstad, Alemania;
- 30 (iv) la cromatografía preparativa se realizó en un instrumento Waters (600/2700 o 2525) equipado con los espectrómetros de masa ZMD o ZQ ESCi y una columna de fase inversa Waters X-Terra o una Waters X-Bridge o una Waters SunFire (C-18, sílice de 5 micrones, 19 mm de diámetro, 100 mm de longitud, tasa de flujo de 40 mL / minuto) utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenían 0.2% de carbonato de amonio) y acetonitrilo como eluyente;

- (v) los rendimientos, cuando se encuentran presentes, no son necesariamente los máximos que pueden obtenerse;
- (vi) en general, las estructuras de los productos finales de Fórmula (I) se confirmaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR); los valores de desplazamiento químico de NMR se midieron en la escala delta [los espectros de la resonancia magnética protónica se determinaron utilizando un instrumento Bruker Avance 500 (500 MHz)]; las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente a menos que se indique de otra forma; se utilizaron las siguientes abreviaturas: s, singulete; d, doblete; t, triplete; q, cuartete; m, multiplete; dd, doblete de dobletes; ddd, doblete de doblete de doblete; dt, doblete de tripletes; bs, señal ancha;
- (vii) en general, los productos finales de la Fórmula (I) también se caracterizaron mediante espectroscopía de masas luego de la cromatografía líquida (LCMS); la LCMS se llevó a cabo utilizando un Waters Alliance HT (2790 & 2795) equipado con un espectrómetro de masas Waters ZQ ESCi o ZMD ESCi y una columna X Bridge 5µm C-18 (2.1 x 50 mm) a una tasa de flujo de 2.4 mL/min, utilizando un sistema de disolvente de 95% A + 5% C a 95% B + 5% C durante 4 minutos, en donde A = agua, B = metanol, C = 1:1 metanol:agua (que contenía 0.2% de carbonato de amonio);
- (viii) los intermediarios generalmente no se caracterizaron completamente y la pureza se evaluó mediante un análisis cromatográfico en capa fina, de espectro de masas, HPLC y/o NMR;
- (ix) los espectros de difracción de polvo de rayos X se determinaron (utilizando un Bruker D4 Analytical Instrument) colocando una muestra del material cristalino sobre un soporte para obleas de cristal de silicio simple (SSC) Bruker y esparciendo la muestra en una capa fina con la ayuda de un portaobjetos de microscopio. La muestra se hizo girar a 30 revoluciones por minuto (para mejorar la estadística de los recuentos) y se irradió con rayos X generados por un tubo de foco fino largo de cobre operado a 40kV y 40mA con una longitud de onda de 1.5418 angstroms. La fuente de rayos X colimada se hizo pasar por una rendija de divergencia variable automática fijada en V20 y la radiación reflejada se dirigió a través de una rendija antidisipación de 5.89 mm y una rendija de detección de 9.55 mm. La muestra se expuso durante 0.03 segundos por incremento de 0.00570° 2- theta (modo de escaneo continuo) en el rango de 2 a 40 grados 2-theta en modo theta-theta. El tiempo de ejecución fue de 3 minutos y 36 segundos. El instrumento estaba equipado con un detector sensible a la posición (Lynxeye). El control y la captura de datos se realizaron por medio de una estación de trabajo Dell Optiplex 686 NT 4.0 con el software Diffrac+. Las personas expertas en la técnica de difracción de polvo de rayos X se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos puede verse afectada, por ejemplo, por granos por encima de los 30 micrones de tamaño y relaciones de aspectos no unitarias, los cuales pueden afectar el análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones puede verse afectada por la altura precisa a la que se encuentra la muestra en el difractor y la calibración de cero del difractor. La superficie plana de la muestra también puede influir de manera leve. Por lo tanto, los datos de los patrones de difracción presentados no deben tomarse como valores absolutos;
- (x) La calorimetría por barrido diferencial se llevó a cabo utilizando un instrumento de DSC Q1000 de TA Instruments. Típicamente, menos de 5 mg de material en un platillo de aluminio estándar equipado con una tapa se calentó en el rango de temperaturas de 25°C a 300°C a una tasa de calentamiento constante de 10°C por minuto. Se utilizó un gas de purga utilizando nitrógeno a una tasa de flujo de 50 mL por minuto; y
- (xi) se utilizaron las siguientes abreviaturas:
- |    |                   |   |
|----|-------------------|---|
|    | ac.               | acuoso                                      |
| 40 | CDCl <sub>3</sub> | deutero-cloroformo                          |
|    | CHCl <sub>3</sub> | cloroformo                                  |
|    | DBU               | 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno          |
|    | DCM               | diclorometano                               |
|    | DEA               | dietil amina                                |
| 45 | DIPEA             | N-etil-N-isopropilpropan-2-amina            |
|    | DMA               | N,N-dimetilacetamida                        |
|    | DMF               | N,N-dimetilformamida                        |
|    | DMSO              | dimetil sulfóxido                           |
|    | DSC               | Calorimetría por barrido diferencial        |
| 50 | DTAD              | (E)-di-terc-butil diaceno-1,2-dicarboxilato |

## ES 2 608 395 T3

	EDCI	1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato
	Éter	éter dietílico
	EtOH	etanol
5	EtOAc	acetato de etilo
	%ee	% de exceso enantiomérico
	HOPO	N-óxido de 2-hidroxi-piridina
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	IPA	isopropilo alcohol
10	MeCN	acetonitrilo
	MeOH	metanol
	MIBK	metil isobutil cetona
	MTBE	metil terc-butil éter
	NMP	1-metil-2-pirrolidona
15	ta	temperatura ambiente
	sat.	saturado
	sol.	solución
	THF	tetrahidrofurano
	TEA	triethyl amina
20	TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo [d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio
	v/v	volumen/volumen
	TFA	ácido trifluoroacético



**Ejemplo 1****1-(4-(5-(5-Amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona**

- 5 Se evaporó hasta secarse ácido 3-hidroxiopropanoico (soln 30% v/v en agua) (200  $\mu$ L, 47.0 mg, 0.52 mmol), luego se sometió a azeotropía con el tolueno. El ácido se disolvió en NMP (1 mL) y se agregaron tamices moleculares (100 mg, 0.26 mmol), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0.136 mL, 0.78 mmol) con posterior adición de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio tetrafluoroborato (209 mg, 0.65 mmol). Después de 30 minutos de agitación, se agregó 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0.26 mmol) y la mezcla se agitó durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó mediante HPLC preparativa utilizando
- 10

una columna de fase inversa Waters X-Bridge (C-18, sílice de 5 micrones, 19 mm de diámetro, 100 mm de longitud, tasa de flujo de 40 ml / minuto) y mezclas cada vez menos polares de agua (conteniendo 0.2% de carbonato de amonio) y acetonitrilo como eluyente.

5 Las fracciones conteniendo el compuesto deseado se evaporaron hasta secarse para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (45.0 mg, 37.9%) como un sólido amarillo claro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.52 (9H, s), 1.79 – 1.94 (2H, m), 2.07 – 2.15 (2H, m), 2.58 (2H, t), 2.84 – 2.94 (1H, m), 3.00 – 3.10 (1H, m), 3.17 – 3.26 (1H, m), 3.53 (1H, t), 3.86 – 3.94 (3H, m), 4.30 (3H, s), 4.56 – 4.62 (1H, m), 9.02 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 456.

10 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (**Ejemplo 1.1**) se preparó como se describe a continuación:

A 20°C, se agregó gota a gota terc-butil 4-carbamoilpiperidina-1-carboxilato (47 g, 205.88 mmol) en diclorometano (500 mL) a una solución agitada de trietiloxonio hexafluorofosfato(V) (56.2 g, 226.47 mmol) en diclorometano (500 mL) durante un período de 45 minutos en nitrógeno. La solución resultante se agitó a 20°C durante toda la noche.

15 Luego se agregó una solución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hasta obtener un pH de 8. Las fases se decantaron y la fase acuosa se extrajo nuevamente con 200 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y luego las fases orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron para proporcionar terc-butil 4-(etoxi(imino)metil)piperidina-1-carboxilato (51.0 g, 97%) como un líquido incoloro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.28 (3H, t), 1.46 (9H, s), 1.47 (2H, m), 1.79 – 1.93 (2H, m), 2.28 (1H, m), 2.73 (2H, m), 4.10 (2H, q), 4.13 – 4.18 (2H, m); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = sin ion másico.

20 A una solución agitada de terc-butil 4-(etoxi(imino)metil)piperidina-1-carboxilato (51 g, 198.95 mmol) en dioxano (500 mL), se agregó formohidrazida (17.92 g, 298.43 mmol).

25 Esta solución se dejó agitar a 40°C durante toda la noche en N<sub>2</sub> lo que resultó en la precipitación de un sólido blanco (intermediario de hidrazida). La mezcla de reacción luego se calentó hasta alcanzar 80°C durante 6 h, se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente y se concentró. El residuo se disolvió en 500 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se agregaron 300 mL de agua. Las fases se decantaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró para proporcionar terc-butil 4-(1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (46.0 g, 92%) como un sólido blanco: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (9H, s), 1.76 (2H, m), 1.98 – 2.11 (2H, m), 2.91 (2H, s), 2.97 – 3.08 (m, 1H), 4.06 – 4.23 (2H, m), 8.05 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = sin ion másico.

30 A una solución agitada de terc-butil 4-(1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (22 g, 87.19 mmol) en diclorometano (250 mL) se agregó hidróxido de sodio 2N (131 mL, 261.58 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente con agitación mecánica y luego se agregó gota a gota una solución de tribromuro de benciltrimetilamonio (37.4 g, 95.91 mmol) en diclorometano (250 mL), manteniendo la temperatura alrededor de 15°C.

35 La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 1 h y se agregó HCl 2N para proporcionar un pH de 5 (manteniendo la temperatura alrededor de 15°C). Las fases se decantaron y la fase orgánica se lavó con H<sub>2</sub>O (2 x 1 L), se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró para proporcionar terc-butil 4-(5-bromo-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (25.00 g, 87%) como un sólido blancuzco: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.67 – 1.84 (2H, m), 1.90 – 2.13 (2H, m), 2.77 – 2.96 (2H, m), 2.98 – 3.10 (1H, m), 3.94 – 4.35 (2H, m); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = sin ion másico.

40 A una suspensión agitada de terc-butil 4-(5-bromo-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (26 g, 78.50 mmol) en tolueno (200 mL) y metanol (50 mL) se agregó gota a gota solución 2M de (diazometil)trimetilsilano en hexano (43.2 mL, 86.35 mmol) en N<sub>2</sub>, manteniendo la temperatura alrededor de 20°C: se observaron desprendimiento de gas y una leve exotermia. La solución amarilla obtenida se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se evaporó y el aceite resultante se purificó sobre sílice, eluyendo con 40% EtOAc en éter de petróleo para proporcionar terc-butil 4-(5-bromo-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (15.00 g, 55.3%) como un aceite: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.65 – 1.78 (2H, m), 1.90 – 2.01 (2H, m), 2.68 – 3.02 (3H, m), 3.83 (3H, s), 3.94 – 4.31 (2H, m); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = sin ion másico.

45 Se agregó en porciones monohidrato de hidrazina (34 mL, 1094.95 mmol) a una suspensión agitada de metil 3-aminopirazina-2-carboxilato (21.3 g, 139.09 mmol) en etanol (65 mL) a t.a. La suspensión resultante se agitó a 60°C durante 2 horas, se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente y se filtró. El sólido se lavó con etanol frío (2 x 25 ml) y se secó hasta obtener un peso constante para proporcionar 3-aminopirazina-2-carbohidrazida (20.75 g, 97%) como un sólido beige: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (DMSO-d<sub>6</sub>) 4.49 (2H, d), 7.46 (2H, br s), 7.78 (1H, d), 8.17 (1H, d), 9.79 (1H, t); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 154.

50 Se agregó en porciones 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio tetrafluoroborato (47.7 g, 148.69 mmol) durante 15 minutos a una suspensión agitada de N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (70.6 mL, 405.51 mmol), ácido

piválico (17.08 mL, 148.69 mmol) y 3-aminopirazina-2-carbohidrazida (20.7 g, 135.17 mmol) en acetonitrilo (350 mL) y la mezcla de reacción se agitó a 80°C durante 20 minutos (se obtuvo una solución). La mezcla de reacción se enfrió hasta alcanzar 0°C y se agregaron N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (70.6 mL, 405.51 mmol), y luego cloruro de 4-metilbenceno-1-sulfonilo (77 g, 405.51 mmol) durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción (suspensión amarilla) se llevó hasta alcanzar reflujo (solubilización) y luego se dejó agitar a temperatura ambiente durante 14 horas proporcionando una solución naranja oscura. La solución se concentró. El residuo se diluyó con diclorometano, se lavó con agua, salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con 0 a 40% acetato de etilo en diclorometano. El disolvente se evaporó hasta secarse. La mezcla resultante se trituró con éter (100 mL), se filtró, se lavó con el mínimo de éter y se secó para proporcionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (20.8 g, 70.2%) como un sólido amarillo claro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.53 (9H, s), 1.58 – 1.68 (2H, m), 6.67 (2H, s), 8.13 (2H, dt); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 220.

Se agregó en porciones 1-bromopirrolidina-2,5-diona (18.57 g, 104.36 mmol) a una solución de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (20.8 g, 94.87 mmol) en THF (320 mL) y la solución se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en diclorometano (300 mL), se lavó con agua (2 x 150 mL), salmuera, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El disolvente se evaporó y el producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice, eluyendo con 0 a 10% acetato de etilo en diclorometano. El disolvente se evaporó hasta secarse para proporcionar 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (25.5 g, 90%) como un sólido beige: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 1.52 (9H, s), 8.23 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 300.

A una suspensión de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (45 g, 150.94 mmol) en tolueno (450 mL) se agregaron 1,1,1,2,2,2-hexametildestanano (37.6 mL, 181.12 mmol) y cloruro de bis(trifenilfosfina) paladio (II) (5.30 g, 7.55 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó con argón y se calentó a 80°C durante 2 horas. (Solubilización inmediatamente después de calentarse, solución naranja luego reprecipitación y se volvió negra, lo que indicó que la reacción se había completado). La mezcla de reacción se enfrió, se concentró y el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se filtró sobre Decalite para eliminar las impurezas insolubles. El filtrado se concentró y se purificó sobre sílice eluyendo con 0 a 10% EtOAc en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El disolvente se concentró para proporcionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(trimetilestanil)pirazin-2-amina (22.63 g, 39.2%) como un sólido naranja: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (CDCl<sub>3</sub>) 0.38 (9H, s), 1.53 (9H, s), 6.49 (2H, br s), 8.13 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 384.

A una suspensión agitada de terc-butil 4-(5-bromo-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (2700 mg, 7.82 mmol) y 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(trimetilestanil)pirazin-2-amina (2988 mg, 7.82 mmol) en 4-metil-2-pentanol (28 mL) se agregaron cloruro de litio (995 mg, 23.46 mmol) y cloruro de bis(trifenilfosfina) paladio (II) (220 mg, 0.31 mmol). La mezcla se desgasificó con argón y se calentó a 140°C durante 2 h. La reacción se enfrió y el precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con isopropanol (25 mL), agua (25 mL) y se secó bajo succión. La fracción orgánica de isopropanol se concentró y el precipitado formado se recogió y combinó con el precipitado principal proporcionando terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (3.0 g, 79%): <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.50 – 1.68 (2H, m), 1.95 (3H, dd), 2.78 – 3.05 (1H, m), 3.96 (3H, d), 4.21 (3H, s), 8.86 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 484.

Una solución de terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (3 g, 6.20 mmol) en TFA (15 mL) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) se agitó a 25°C durante 1 hora. La mezcla se sometió a azeotropía con tolueno, se agregaron una solución 7N de amoníaco en metanol y diclorometano y la mezcla se adsorbió sobre gel de sílice. El producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con 0 a 8% metanol en diclorometano y luego 0 a 10% amoníaco metanólico en diclorometano. El disolvente se evaporó hasta secarse para proporcionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (2.040 g, 86%) como un sólido cristalino amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 1.55 – 1.66 (2H, m), 1.86 (2H, dd), 2.52 – 2.61 (2H, m), 2.69 – 2.78 (1H, m), 2.95 – 3.02 (2H, m), 4.20 (3H, s), 8.86 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 384.

#### Aislamiento de la forma cristalina simple del Ejemplo 1

Los espectros de difracción de polvo de rayos X del material aislado anteriormente demostraron ser cristalinos pero una mezcla de formas polimórficas. Este material tuvo un punto de fusión de 226.4°C (inicio).

El material de la forma A se produjo precipitando el material original en acetonitrilo a 25°C. Se colocaron aproximadamente 20 mg del material original en un vial con un agitador magnético y se agregaron aproximadamente 2 mL de acetonitrilo, luego el vial se selló fuertemente con una tapa y se dejó agitar sobre una placa de agitación magnética. Después de aproximadamente 5 días, la muestra se retiró de la placa, se sacó la tapa y la suspensión se dejó secar en condiciones ambiente antes de analizarse mediante XRPD y DSC. Se determinó que esta forma (Forma A) era cristalina por XRPD. Este material tuvo un punto de fusión de 227.2°C (inicio).

La misma forma cristalina puede hacerse agitando el material bruto en acetonitrilo toda la noche a temperatura ambiente, filtrando luego el sólido resultante con acetonitrilo frío y secando.

En un aspecto de la invención, se proporciona un proceso para formar una forma cristalina del Ejemplo 1 (Forma A) precipitando una muestra del compuesto en acetonitrilo.

Diez picos de difracción de polvo de rayos X se muestran en la Tabla a continuación:

**Diez picos de difracción de polvo de rayos X para la Forma A del Ejemplo 1**

Ángulo 2-Theta (2θ)	% de Intensidad
5.1	100.0
18.0	22.5
10.2	22.0
11.7	17.8
19.4	14.5
18.5	14.2
14.8	12.6
26.7	11.0
26.6	10.6
17.8	9.9

5 Un espectro de difracción de polvo de rayos X de la Forma A del Ejemplo 1 se muestra en la Figura 1.

El análisis por DSC del Ejemplo 1 Forma A muestra una endotermia de fusión con un inicio de 227.2°C y un pico a 228.6°C (Figura 2).

De esta forma, el análisis por DSC mostró que la Forma A del Ejemplo 1 es un sólido con un punto de fusión alto con un inicio a aproximadamente 227.2°C y un pico a 228.6° C.

10 Una DSC de la Forma A del Ejemplo 1 se muestra en la figura 2.

Difracción de polvo de rayos X

Instrumento analítico: Bruker D4.

15 El difractograma de polvo de rayos X se determinó colocando una muestra del material cristalino sobre un soporte para obleas de cristal de silicio simple (SSC) Bruker y esparciendo la muestra en una capa fina con la ayuda de un portaobjetos de microscopio. La muestra se hizo girar a 30 revoluciones por minuto (para mejorar la estadística de los recuentos) y se irradió con rayos X generados por un tubo de foco fino largo de cobre operado a 40kV y 40mA con una longitud de onda de 1.5418 angstroms. La fuente de rayos X colimada se hizo pasar por una rendija de divergencia variable automática fijada en V20 y la radiación reflejada se dirigió a través de una rendija antidispersión de 5.89 mm y una rendija de detección de 9.55 mm. La muestra se expuso durante 0.03 segundos por incremento de 0.00570° 2-theta (modo de escaneo continuo) en el rango de 2 a 40 grados 2-theta en modo theta-theta. El tiempo de ejecución fue de 3 minutos y 36 segundos. El instrumento estaba equipado con un detector sensible a la posición (Lynxeye). El control y la captura de datos se realizaron por medio de una estación de trabajo Dell Optiplex 686 NT 4.0 con el software Diffrac+.

20 Los expertos en la técnica de difracción de polvo de rayos X se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos puede verse afectada, por ejemplo, por granos por encima de los 30 micrones de tamaño y relaciones de aspecto no unitarias, los cuales pueden afectar el análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones puede verse afectada por la altura precisa a la que se encuentra la muestra en el difractómetro y la calibración de cero del difractómetro. La superficie plana de la muestra también puede influir de manera leve. Por lo tanto, los datos de los patrones de difracción presentados no deben tomarse como valores absolutos.

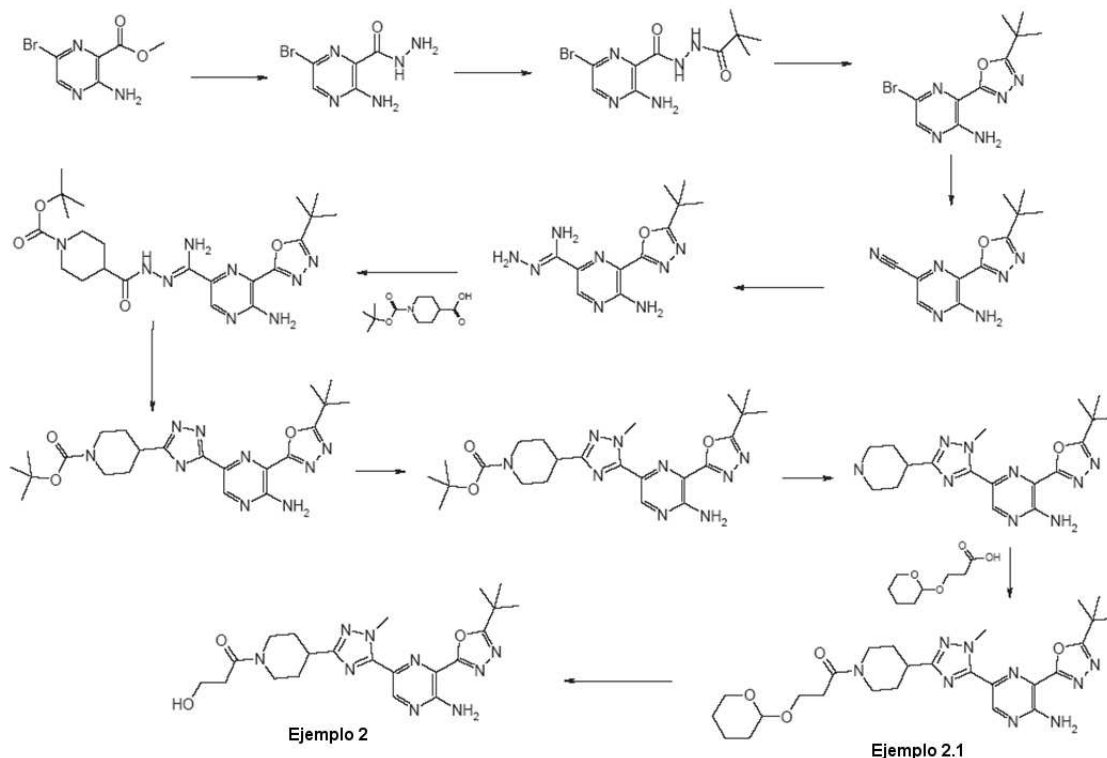
**Calorimetría de barrido diferencial.**

30 Instrumento analítico: TA Instruments Q1000 DSC.

Típicamente, menos de 5 mg de material en un platillo de aluminio estándar equipado con una tapa se calentó en el rango de temperaturas de 25°C a 300°C a una tasa de calentamiento constante de 10°C por minuto. Se utilizó un gas de purga utilizando nitrógeno - tasa de flujo 50 ml por minuto.

Una síntesis alternativa del compuesto del Ejemplo 1 se proporciona a continuación como Ejemplo 2.

**Ejemplo 2: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona**



5 Se agregó piridina 4-metilbenenosulfonato (3.58 g, 14.25 mmol) a una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (37 g, 68.57 mmol) en metanol (275 mL) en nitrógeno. La mezcla se agitó a 60°C durante 1.5 horas. La mezcla se volvió soluble después de 5 minutos. La mezcla se mantuvo a 50°C durante toda la noche tiempo durante el cual se formó un precipitado. La mezcla de reacción se disolvió en diclorometano (400 mL), se lavó con agua (300 mL) y salmuera (100 mL). Los extractos acuosos se lavaron nuevamente con DCM (100 mL) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron. El producto bruto se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con 100% acetato de etilo a 10:50:40 metanol/acetato de etilo/DCM. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron hasta secarse para proporcionar un sólido beige (24.5g). El sólido se suspendió durante toda la noche en acetonitrilo (500 mL), se filtró y se secó bajo alto vacío para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (**Ejemplo 2**) (24g, 78%) como un sólido crema: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.51 (9H, s), 1.55 – 1.68 (1H, m), 1.68 – 1.84 (1H, m), 1.96 – 2.13 (2H, m), 2.78 – 2.93 (1H, m), 2.98 – 3.1 (1H, m), 3.19 – 3.3 (1H, m), 3.71 (2H, q), 3.93 – 4.04 (1H, m), 4.27 (3H, s), 4.35 – 4.48 (1H, m), 4.54 (1H, t), 7.96 (2H, s), 8.92 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 456

20 (4-(5-(5-Amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (**Ejemplo 2.1**) se preparó como se describe a continuación:

25 Se agregó gota a gota hidrato de hidrazina (23.59 mL, 480.75 mmol) a una mezcla agitada de metil 3-amino-6-bromopirazina-2-carboxilato (100 g, 418.04 mmol) en EtOH (2 L). La mezcla se calentó a 50°C en nitrógeno. La suspensión espesa resultante se agitó a 50°C durante 16 horas. Se agregó más hidrazina (2.5 mL) en una porción y la suspensión se agitó a 50°C durante a otras 24 horas. Se cargó etanol (500 mL) en la mezcla de reacción espesa y la mezcla se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con etanol (1 L) y se secó al vacío para proporcionar 3-amino-6-bromopirazina-2-carbohidrazida (98 g, cuantitativo) como un sólido crema: <sup>1</sup>H Espectro de NMR; (DMSO-d<sub>6</sub>) 4.52 (2H, s), 7.59 (2H, s), 8.30 (1H, s), 9.74 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 232.

30 Se agregó anhídrido píválico (165 mL, 815.38 mmol) a una mezcla agitada de 3-amino-6-bromopirazina-2-carbohidrazida (172 g, 741.26 mmol) en acetonitrilo (1.8 L) y la mezcla se calentó a 80°C durante 1 hora. La reacción se dejó agitar durante 16 horas. El material sólido amarillo requerido se aisló mediante filtración. El filtrado se dividió entre EtOAc (2 L) y bicarbonato de sodio acuoso (2L). La capa orgánica se lavó con salmuera saturada y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. La solución se filtró y se concentró para proporcionar un sólido pegajoso naranja que se trituró con MTBE (250

mL). El sólido insoluble amarillo se aisló mediante filtración y este material mostró ser idéntico al primer sólido. Los sólidos combinados se secaron en el horno de vacío a 50°C durante 3 días para proporcionar 3-amino-6-bromo-N'-pivaloilpirazina-2-carbohidrazida (224 g, 96%) como un sólido amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.17 (9H, s), 7.62 (2H, s), 8.37 (1H, s), 9.42 – 9.56 (1H, m), 10.09 – 10.23 (1H, m); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 318.

5 Se agregó en porciones cloruro *p*-toluenosulfonilo (164 g, 861.60 mmol) a una suspensión de 3-amino-6-bromo-N'-pivaloilpirazina-2-carbohidrazida (227 g, 718.00 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (297 mL, 1795.01 mmol) en acetonitrilo (2200 mL). La mezcla se agitó durante 2 horas a 70°C. La reacción se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se dividió entre acetato de etilo (2 L) y solución de bicarbonato de sodio (2 L). La capa orgánica se lavó con salmuera saturada, se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida. El sólido marrón/beige resultante se trituró con MTBE caliente (1000 mL) y se aisló mediante filtración y se secó para proporcionar 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina como un sólido amarillo (187 g, 87%). Las aguas madre se evaporaron hasta secarse. El sólido crudo se trituró con MTBE (500 mL), se filtró y se lavó con 100 mL de MTBE. El sólido resultante se secó con aire durante toda la noche para proporcionar una segunda cosecha de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (36 g, 17%): <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.43 (9H, s), 7.70 (2H, s), 8.39 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 298.

En una preparación alternativa, a 3-amino-6-bromo-N'-pivaloilpirazina-2-carbohidrazida (2301 g, 7.28 mol) en MeCN (10.8 L) se agregó DIPEA (3.044 L, 17.48 mol) y cloruro de *p*-toluenosulfonilo (1665 g, 8.73 mol) en porciones (~280 g x 6) a 50°C durante un período de 30 min. La temperatura de reacción se mantuvo entre 65-70°C controlando la tasa de adición. Tras completar la adición, la mezcla de reacción se agitó a 70°C durante 1 h. La mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se desactivó con NaHCO<sub>3</sub> al 5% (acuoso, 24.2 L). La suspensión resultante se agitó durante 30 min y luego se filtró. El producto se lavó con agua (14.8 L), se secó por succión y se secó a 50°C durante 16 h. El producto se disolvió en DCM (12 L) y se separaron las fases. La fase orgánica se introdujo en un lecho de sílice (6 kg) y el producto se eluyó con 20% de EtOAc/DCM (8 x 10 L). La concentración de las fracciones que contenían el producto proporcionó 1987 g (92% de rendimiento) con una pureza de 99.8% por HPLC.

25 Una corriente de gas nitrógeno se pasó a través de una solución de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (89.35 g, 239.75 mmol) en DMA (1.2 L) durante 20 minutos. Se agregaron secuencialmente dicitohexil(2',4',6'-triisopropilbifenil-2-il)fosfina (11.43 g, 23.98 mmol), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (5.49 g, 5.99 mmol), zinc (1.568 g, 23.98 mmol) y dicianozinc (16.89 g, 143.85 mmol) a la mezcla agitada. La mezcla se calentó hasta alcanzar 100°C y se agitó durante 1 hora. La mezcla se enfrió y se dividió entre DCM (3 L) y agua (1 L). La mezcla negra se filtró a través de celite y la capa orgánica se separó. La solución se lavó con agua y luego salmuera. La solución se secó con sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. El residuo se trituró con MTBE y se aisló mediante filtración, lavándose con MTBE. La torta de filtración se secó al vacío para proporcionar 5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbonitrilo (55.7 g, 95%) como un sólido naranja claro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.46 (9H, s), 6.02 (1H, s), 8.38 (2H, s); Espectro de masa [M-H]<sup>-</sup> = 242.

35 El producto se puede suspender en heptanos y luego filtrarlo y secarlo, en lugar de tritararlo con MTBE.

Se agregó hidrato de hidrazina (82 mL, 1.69 mol) a 5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbonitrilo (55 g, 225.18 mmol) en IPA (200 mL) y la mezcla se calentó a 50°C en nitrógeno durante 16 horas. La mezcla se enfrió en un baño de hielo. El precipitado resultante se recogió mediante filtración, se lavó con IPA y éter dietílico y se secó hasta obtener un peso constante para proporcionar (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbohidrazonamida (49.2 g, 79%) como un sólido amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 5.26 (2H, s), 5.58 (2H, s), 7.56 (2H, s), 8.75 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 277.

45 Se agregó hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (74.3 g, 195.44 mmol) a una solución de ácido N-Boc-isonipecóico (41.1 g, 179.15 mmol) y 4-metilmorfolina (35.9 mL, 325.74 mmol) en DMA (800 mL). La mezcla se agitó durante 10 minutos, luego se agregó (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbohidrazonamida (45 g, 162.87 mmol) a la solución en una porción (se observó exotermia a partir de 22°C a 27°C). Después de unos pocos minutos el producto cristalizó a partir de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se eliminó del recipiente y se filtró a través de un material sinterizado. Se agregó más DMA para lavar el producto de los costados del recipiente (150 mL) y esto se vertió en la torta de filtración. Se agregó isopropanol (600 mL) al recipiente y el remanente del producto en el recipiente se suspendió en este disolvente utilizando agitación vigorosa. La suspensión de isopropanol se utilizó para lavar la torta de filtración una vez que la DMA había sido eliminada mediante succión. La torta de filtración se secó por succión, luego se lavó con MTBE y se secó por succión una vez más. La torta de filtración se secó al vacío para proporcionar (Z)-terc-butil 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinacarbonil)piperidina-1-carboxilato (76 g, 95%) como un sólido amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.63 - 1.9 (2H, m), 2.33 - 2.6 (2H, m, oscurecido por señal de DMSO), 2.63 - 3.03 (2H, m), 3.18 - 3.48 (4H, m, oscurecido por señales de agua), 3.88 - 4.11 (2H, m), 6.43 (2H, s), 7.76 (2H, br), 8.84 (0.5H, s), 8.87 (0.5H, s), 9.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 488.

En una preparación alternativa, el ácido N-Boc-isonipecóico se puede preparar in situ como se indica a continuación: se disolvió ácido isonipecóico (858 g, 3.74 mol) en DMA (25.3L) y se agregó 4-metilmorfolina (393 mL, 3.74 mol). Se agitó durante 5 min y se agregó cloroformiato de isobutilo (489 mL, 3.74 mol). La mezcla de reacción se agitó a 25°C durante 2 h y se enfrió hasta 15°C antes de agregar (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-

carbohidrazonamida (940 g, 3.4 mol) en porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se agitó durante 1-2 h a 15°C. Se agregó agua (20.5 L) en porciones durante 1 h y se agitó durante 1 h antes de filtrarla. Luego la torta de filtración se lavó con agua (4 x 4 L) y se secó por succión sobre el filtro antes de secarla en un horno de vacío a 50°C hasta que estuviera seca para proporcionar el producto deseado.

5 Se agregó ácido acético (200 mL) a dioxano (500 mL) en un recipiente con doble camisa fijo de 3L y la solución se calentó hasta alcanzar 70°C en nitrógeno. Se agregó en porciones (Z)-terc-butil 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinacarbonil)-piperidina-1-carboxilato (74.5 g, 152.80 mmol) a la mezcla tibia. Después de 10 minutos, la temperatura aumentó a 100°C (reflujo leve). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 1.5 horas (suspensión) y luego se mantuvo a 80°C durante toda la noche (la solución se formó después de mantener durante toda la noche). La solución resultante se concentró a presión reducida, luego se diluyó con tolueno, se evaporó hasta secarse, se recogió con tolueno y se concentró nuevamente. El aceite residual se mezcló con un poco de acetato de etilo y se concentró hasta secarse. Un sólido se cristalizó a partir de la solución que se trituró con MTBE (200 mL) y se aisló mediante filtración. La torta de filtración se lavó con agua y MTBE para proporcionar terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (50 g, 70%) como un sólido gris.

El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar un sólido amarillo. Este material se trituró con MTBE y se filtró. La torta de filtración se lavó con acetato de etilo y luego MTBE para proporcionar una segunda cosecha como un sólido amarillo claro (4.93g, 7%). Este material fue idéntico a la primera cosecha: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.17 (9H, s), 1.22 (9H, s), 1.29 – 1.47 (2H, m), 1.67 – 1.78 (2H, m), 2.57 – 2.87 (3H, m), 3.57 – 3.92 (2H, m), 7.56 (2H, br), 8.56 (1H, s), 13.47 (2H, br s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

25 Se agregó 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (19.87 mL, 132.90 mmol) a una suspensión de terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (48 g, 102.23 mmol) en 2-metil THF (300 mL). Se obtuvo una solución oscura después de 5 minutos que se trató con carbón y se filtró a través de una almohadilla de celite, lavándose el carbón con más 2-metil THF (100 mL). El filtrado se agitó con un agitador de aire a -5°C en un recipiente fijo con camisa de 3 L bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agregó 2-metil THF (100 mL) para ayudar a agitar la suspensión amarilla. Se agregó gota a gota yodometano (7.96 mL, 127.78 mmol) durante 15 minutos. La mezcla se agitó durante 2 horas y la mezcla de reacción se entibió hasta alcanzar temperatura ambiente. Después de 16 horas, se agregó más yodometano (6 mL) y DBU (20 mL) y se continuó agitando durante 16 horas. La mezcla se vertió en agua y se agitó durante 5 minutos. El material insoluble se aisló como un sólido beige y se secó al vacío para proporcionar terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (24.77 g, 50.1%). Las aguas madre se concentraron a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna sobre sílice utilizando MTBE como el eluyente. Una segunda cosecha del producto deseado (13.04 g, 26%) se obtuvo de esta forma como un sólido amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.47 (9H, s), 1.51 (9H, s), 1.57 – 1.76 (2H, m), 1.94 – 2.1 (2H, m), 2.87 – 3.09 (3H, m), 3.9 – 4.08 (2H, m), 4.26 (3H, s), 7.97 (2H, br, s), 8.92 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 484.

40 Se agregó terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (36.81 g, 76.12 mmol) a una solución de ácido 2,2,2-trifluoroacético (100 mL, 1305.87 mmol) en DCM (100 mL). La mezcla se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM (1.5L) y se agregó a amoníaco concentrado agitado vigorosamente (150 mL) en agua (400 mL). Lo acuoso se lavó con DCM (400 mL) y las soluciones orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron hasta secarse para proporcionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (30.0 g, 103%) como un sólido amarillo:

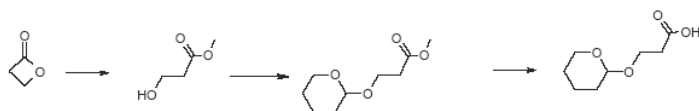
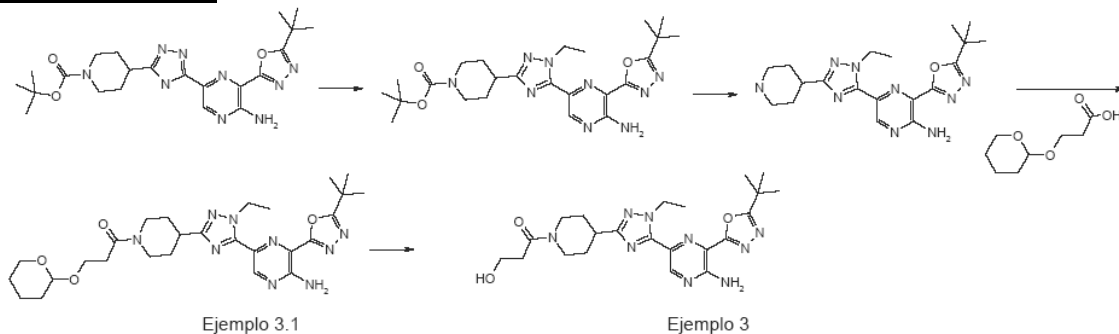
<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.44 (9H, s), 1.54 – 1.69 (2H, m), 1.8 – 1.92 (2H, m), 2.53 – 2.63 (2H, m), 2.68 – 2.83 (1H, m), 2.93 – 3.05 (2H, m), 4.19 (3H, s), 7.89 (2H, br), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 384.

45 Se agregó en porciones hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (30.4 g, 80.04 mmol), a una solución agitada de ácido 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoico (12.67 g, 72.76 mmol) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (25.3 mL, 145.52 mmol) disuelta en acetonitrilo (200 mL) a 25°C. La solución resultante se agitó a 25°C durante 20 minutos y luego se agregó en porciones 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (30 g, 72.76 mmol), lavando la última porción en la mezcla como una suspensión en acetonitrilo (100 mL). Después de agitar durante 1 hora, el precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con acetonitrilo y se secó al vacío para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (35.0 g, 89%) como un sólido beige. El filtrado se diluyó con DCM (600 mL), se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 2 a 2.5% amoníaco 7N en metanol con diclorometano. Una segunda cosecha de producto (3.31 g, 6.13 mmol, 8.43%) también se obtuvo como un sólido crema. Ambas muestras se combinaron para proporcionar un sólido beige: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.44 (9H, s), 1.52 – 1.79 (4H, m), 1.88 – 2.04 (2H, m), 2.53 – 2.73 (2H, m), 2.73 – 2.87 (1H, m), 2.91 – 3.05 (1H, m), 3.13 – 3.24 (1H, m), 3.37 – 3.47 (1H, m), 3.53 – 3.65 (1H, m), 3.7 – 3.8 (1H, m), 3.81 – 3.89 (1H, m), 3.89 – 3.99 (1H,

m), 4.20 (3H, s), 4.29 – 4.4 (1H, m), 4.54 – 4.61 (1H, m), 7.60 - 8.20 (2H, br), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 540.

### Ejemplo 3

#### 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona



Se agregó piridina 4-metilbencenosulfonato (11.62 g, 46.24 mmol) a una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (12 g, 231.19 mmol) en metanol (1 L) en nitrógeno. La mezcla se agitó a 60°C durante 1.5 horas. La mezcla se volvió soluble después de 5 minutos. La mezcla se mantuvo a 50°C durante toda la noche, tiempo durante el cual se formó un precipitado. El material sólido se aisló mediante filtración y se lavó con agua y acetonitrilo. Este material aún contenía impurezas menores de la etapa previa y se requirió purificación adicional. El material se disolvió en diclorometano y se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (0% metanol / DCM a 10% metanol / DCM). El producto deseado, 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (**Ejemplo 3**) (92 g, 85%) se aisló, de esta forma, como un sólido crema (Forma A): <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 – 1.51 (12H, m), 1.51 – 1.78 (2H, m), 1.89 – 2.05 (2H, m), 2.72 – 2.86 (1H, m), 2.91 – 3.05 (1H, m), 3.12 – 3.24 (1H, m), 3.64 (2H, q), 3.83 – 4.01 (1H, m), 4.29 – 4.41 (1H, m), 4.47 (1H, t), 4.58 (2H, q), 8.26 (2H, s), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (**Ejemplo 3.1**) se preparó como se describe a continuación:

Se agregó 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511.14 mmol) a una suspensión de terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (150 g, 319.46 mmol) en 2-metil THF (1.2 L). Se agregó yodoetano (46 mL, 575.03 mmol) y la mezcla se agitó durante 16 horas a 35°C. Se agregaron más yodoetano (46 mL, 575.03 mmol) y 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511.14 mmol) y se continuó agitando durante 24 horas a 35°C. La mezcla se vertió en agua y el material insoluble se aisló mediante filtración, se lavó con agua y MTBE y se secó al vacío para proporcionar terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (116 g, 73.0%) como un sólido amarillo. El filtrado se extrajo con DCM y la solución orgánica se secó con sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en columna sobre sílice utilizando elución en gradiente (30% MTBE / heptano a 100% MTBE). Una segunda cosecha del producto deseado (12 g, 24.12 mmol, 7.55%) se aisló, de esta forma, como un sólido amarillo que luego se combinó con la primera cosecha: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.48 (3H, t), 1.52 – 1.69 (2H, m), 1.87 – 2.04 (2H, m), 2.79 – 3.03 (3H, m), 3.86 – 4.03 (2H, m), 4.59 (2H, q), 7.89 (2H, s), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 498.

Un disolvente adecuado para la reacción precedente también puede ser THF.

Se agregó TFA (400 mL) en porciones a una solución de terc-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (126 g, 253.22 mmol) en DCM (400 mL). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentró a presión reducida, se disolvió en DCM (1L) y se agregó lentamente a una solución agitada vigorosamente de amoníaco concentrado acuoso (500 mL) en agua a 0°C. La solución orgánica se separó de lo acuoso y se concentró a presión reducida\* para proporcionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (101 g, 100%) como un sólido amarillo: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 – 1.52 (12H, m), 1.57 – 1.73 (2H, m), 1.83 – 1.93 (2H, m), 2.57 – 2.7 (2H, m), 2.71 – 2.84 (1H, m), 2.96 – 3.09 (2H, m), 4.58 (2H, q), 8.06 (2H, s), 8.84 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 398.

\*En otro experimento en escala similar (aproximadamente 170g de material de partida) se utilizó el siguiente



procedimiento de aislamiento: Las capas se separaron y la capa superior (emulsión con un sólido) se filtró. El sólido se lavó con DCM (0.5 L) y el filtrado se transfirió a un embudo de separación. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (0.5 L). Las capas orgánicas se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron. El producto se secó a 50°C durante toda la noche (81.75 g). El sólido de la extracción se suspendió en agua (200 mL) durante 30 min a temperatura ambiente y se eliminó por filtración. El producto se secó a 50°C al vacío (61.8 g).

Una variación adicional es como se indica a continuación:

Una suspensión de *tert*-butil 4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato (3009.5 g, 6.05 mol) en DCM (9 L) se enfrió hasta 5-10°C en N<sub>2</sub>. Se agregó TFA (9 L) en porciones a la suspensión a la vez que se mantenía la temperatura < 30°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla se concentró, el residuo resultante se disolvió en agua (30 L) y se agregó lentamente a una solución acuosa de amoníaco al 35% (12 L) a 0-5°C. La suspensión se agitó durante 30 min, luego el producto se separó por filtración y se lavó con agua (2 x 6L). El producto se secó a 50°C al vacío durante 2 días (2496 g).

Se agregó en porciones hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HATU, 106 g, 279.51 mmol), a una solución agitada de ácido 3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propanoico (44.3 g, 254.10 mmol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (89 mL, 508.21 mmol) disuelta en acetonitrilo (600 mL) a 25°C. La solución resultante se agitó a 25°C durante 20 min luego se agregó en porciones 3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (101 g, 254.10 mmol) lavando la última porción en la mezcla como una suspensión en acetonitrilo (300 mL). Después de agitar durante 1 hora el precipitado se recogió mediante filtración, se lavó con acetonitrilo y se secó al vacío para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (128 g, 91%) como un sólido beige. El filtrado se diluyó con DCM (600 ml), se lavó con agua, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 2 a 2.5% amoníaco 7N en metanol con diclorometano. Una segunda cosecha del producto deseado (40 g, 72.2 mmol, 28.4%) se obtuvo como un sólido crema que se combinó con la primera cosecha: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.29 – 1.48 (16H, m), 1.48 – 1.75 (4H, m), 1.83 – 1.99 (2H, m), 2.48 – 2.68 (2H, m), 2.68 – 2.79 (1H, m), 2.87 – 2.99 (1H, m), 3.07 – 3.19 (1H, m), 3.32 – 3.42 (1H, m), 3.47 – 3.6 (1H, m), 3.64 – 3.75 (1H, m), 3.75 – 3.84 (1H, m), 3.84 – 3.95 (1H, m), 4.24 – 4.39 (1H, m), 4.47 – 4.6 (3H, m), 7.84 (2H, s), 8.79 (1H, s); Espectro de masa [M+Na]<sup>+</sup> = 577.

Preparación alternativa:

A una solución de ácido 3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi) propanoico (48.80 g, 0.2774 mol) y *N*-etil-*N*-isopropilpropan-2-amina (86.96 mL, 0.4993 mol) en THF (552 mL) se agregó hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (115.73 g, 0.3051 mol) en porciones a TA en nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 20 min, luego se agregó en porciones 3-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (122.5 g (110.25 g activa), 0.2774 mol) durante 1 h. Después de 3.5 h, la mezcla se concentró y el residuo se suspendió en MeCN (275 mL) durante 15 min a temperatura ambiente. El producto se retiró mediante filtración, se lavó con MeCN (3 x 110 mL) y se secó durante toda la noche a 50°C al vacío. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (131.9 g, 96%).

En una preparación alternativa adicional, se puede utilizar HBTU (hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio) en THF como agente de acoplamiento en lugar de HATU.

### Preparación alternativa del Ejemplo 3

A una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)propan-1-ona (131.9 g, 0.2382 mol) en metanol (1045 mL) se agregó p-toluenosulfonato de piridinio (11.97 g, 47.7 mmol) en N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se agitó a 60°C durante 5.5h luego a 50°C durante toda la noche. La mezcla de reacción se enfrió hasta alcanzar 0°C y el sólido se retiró mediante filtración. El producto se suspendió en agua (250 mL) durante 20 min a temperatura ambiente, se eliminó por filtración, se lavó con agua (3x40 mL) y se secó a 50°C al vacío. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (21.4g) como la Forma A (ver más adelante).

Los licores de metanol se concentraron y el sólido resultante se suspendió en agua (0.6 L) durante 20 min a temperatura ambiente. El sólido se aisló mediante filtración y se lavó con agua (3x100 mL). La torta de filtración se suspendió una segunda vez en agua (0.5 L) durante 20 minutos más. El producto se aisló mediante filtración, se lavó con agua (100 mL) y se secó a 50°C al vacío. Esto proporcionó 81.9 g 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (81.9g) como la Forma A.

Ambas cosechas se combinaron (103.3 g), se sembraron con la Forma B (16.68 g) y se suspendieron en MeCN (826 mL) a temperatura ambiente durante toda la noche. Esto proporcionó 117.4 g de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-*tert*-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como un sólido amarillo claro (117.4g), Forma B (ver más adelante). Este material se purificó adicionalmente suspendiéndolo en heptano (7.5 vol. rel.)

durante 1 hora. La mezcla se filtró, se secó por succión en el filtro y se secó a 50°C en un horno de vacío durante toda la noche para obtener 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (102.5 g) como la Forma B.

La Forma B también se puede preparar suspendiendo la Forma A en MeCN sin sembrar.

5 La Forma A o B también se puede convertir en la Forma C como se indica a continuación:

Una suspensión de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (por ejemplo, la forma B preparada según los procesos descritos anteriormente) en IPA (12 vol) se calentó a reflujo hasta que el sólido se disolvió. La solución se filtró en caliente, luego se enfrió hasta alcanzar temperatura ambiente. Esto proporcionó 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como un sólido amarillo claro (99.3g, 97%) como la Forma C.

La Forma C también se puede convertir en la Forma B como se indica continuación:

En un matraz con reborde de 10 L, se calentó la Forma Forma C (377.8 g, porción 1) en MIBK (7900 mL) hasta 110-115°C para obtener una solución. Se dejó que la solución se enfriara hasta 97-103°C y se filtró con pulido inmediatamente en un recipiente de 50 L que contenía una semilla de la Forma B (0.8 g) en acetonitrilo (8220 mL) agitando a -15°C. Durante la adición, la temperatura en el recipiente de 50 L se mantuvo entre -15 y 25°C mediante refrigeración con camisa. Se agregaron tres porciones adicionales del compuesto disuelto en MIBK mediante un método similar. Se agregó una semilla de la Forma B (0.8 g) a la suspensión resultante y luego la mezcla se agitó a 10-20°C durante toda la noche. El análisis del proceso confirmó la forma deseada (Forma B), sin Forma C ni forma amorfa visibles. La mezcla se filtró y se lavó con acetonitrilo (3340 mL). El sólido se secó al horno durante 2 días (el sólido se deshizo durante el secado en un polvo y una mezcla de agregados pequeños con un tamaño de ~1 mm a ~3-4 mm) hasta que se obtuvo un peso constante. Rendimiento = 1532.8 g (93.5%).

Se preparó ácido 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoico como se describe a continuación:

A una solución agitada de metanol (2.4 L) y ácido sulfúrico concentrado (44.4 mL, 832.61 mmol) a 0°C en nitrógeno se agregó, gota a gota, beta-propiolactona (175 mL, 2.78 mol). Esta solución se dejó agitar a temperatura ambiente durante 2 días. La mezcla de reacción se enfrió hasta alcanzar 10°C antes de agregar, en porciones, bicarbonato de sodio (145 g, 1.72 mol), la suspensión resultante se dejó agitar a temperatura ambiente durante 75 minutos. Esta solución se filtró, la torta de filtración se lavó con metanol (800mL). El filtrado se evaporó hasta obtener un aceite que se disolvió nuevamente en diclorometano (1.2 L) y se agitó durante 60 minutos antes de volver a filtrarse. Esta solución se filtró antes de evaporarse para proporcionar metil 3-hidroxiopropanoato (219 g, 76%) como un aceite. <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 2.50 (2H, t), 3.63 (3H, s), 3.78 (2H, t).

Se agregó p-toluenosulfonato de piridinio (7.65 g, 30.45 mmol) a una solución clara de metil 3-hidroxiopropanoato (63.4 g, 609.00 mmol) y 3,4-dihidro-2H-pirano (78 mL, 852.60 mmol) en diclorometano (650 mL) a temperatura ambiente en nitrógeno para proporcionar una solución turbia. Esto se dejó agitar a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción se lavó con agua (250 mL) y salmuera (250 mL) antes de secarse (MgSO<sub>4</sub>) y evaporarse hasta obtener un aceite. Este producto bruto se purificó mediante cromatografía de sílice instantánea, gradiente de elución 15 a 30% EtOAc en heptano. Las fracciones puras se evaporaron hasta secarse para proporcionar metil 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoato (67.7 g, 59.0%) como un aceite incoloro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (4H, dddd), 1.55 – 1.84 (2H, m), 2.55 (2H, t), 3.33 – 3.53 (1H, m), 3.53 – 3.7 (4H, m), 3.78 (1H, ddd), 3.93 (1H, dt), 4.42 – 4.72 (1H, m); Espectro de masa [MH]<sup>+</sup> = 189.

Se agregó hidróxido de sodio (2M, 349 mL, 697.58 mmol) a una solución de metil 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoato (67.68 g, 359.58 mmol) en THF (680 mL) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El THF se retiró al vacío, la capa acuosa luego se lavó con acetato de etilo (260 mL), antes de enfriarse hasta alcanzar 0°C y se acidificó cuidadosamente hasta obtener pH 5 mediante la adición de ácido clorhídrico (2M). El producto se extrajo con acetato de etilo (3 x 250 mL) antes de secarse (MgSO<sub>4</sub>) y evaporarse para proporcionar ácido 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoico (57.0 g, 91%) como un aceite claro. Este material se disolvió en acetato de etilo (750 mL), luego se lavó con agua (3 x 250 mL) y salmuera (250 mL) para eliminar el ácido acético remanente. La solución orgánica se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporó para proporcionar ácido 3-(tetrahydro-2H-piran-2-iloxi)propanoico (45.67g, 72.9%) como un aceite incoloro: <sup>1</sup>H Espectro de NMR: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.43 – 1.67 (4H, m), 1.65 – 1.95 (2H, m), 2.68 (2H, t), 3.48 – 3.58 (1H, m), 3.73 (1H, dt), 3.88 (1H, ddd), 4.02 (1H, dt), 4.59 – 4.7 (1H, m); Espectro de masa [M-H]<sup>-</sup> = 173.

El Ejemplo 3, tal como se aisló anteriormente, fue un sólido cristalino en tres diferentes formas cristalinas, descritas en la presente como Formas A, B y C.

La estructura del cristal de la Forma A del Ejemplo 3 puede caracterizarse mediante XRPD y DSC.

Los métodos para llevar a cabo estas técnicas son como se describe para el Ejemplo 1.

**Diez picos de difracción de polvo de rayos X para la Forma A del Ejemplo 3**

Ángulo 2-Theta (2θ)	% de Intensidad
4.8	100
10.0	89.2
14.6	81.9
5.2	59.4
19.9	53.6
10.4	49.3
25.4	48.7
23.6	48.6
24.4	43.9
16.2	36.3

La XRPD de la Forma A del Ejemplo 3 se muestra en la figura 3.

5 El análisis por DSC de la Forma A del Ejemplo 3 muestra una endotermia inicial con un inicio de 27.0°C y un pico a 63.0°C; otros cambios endotérmicos se observan con inicios y picos a las siguientes temperaturas: 166.5°C y 168.7°C, 172.2°C y 173.2°C y una fusión final a 174.8°C y un pico a 175.7°C (Figura 4).

De esta forma, el análisis por DSC mostró que la Forma A del Ejemplo 3 es un material solvatado con un inicio de desolvatación a aproximadamente 27.0°C y un pico a aproximadamente 63.0°C.

Los espectros de difracción de polvo de rayos X para el Ejemplo 3 (Forma A) mostraron que el material era cristalino. Este material tuvo un punto de desolvatación de 28°C (inicio).

10 El Ejemplo 3 también puede existir en una forma polimórfica alternativa, a la que se hace referencia en la presente como Forma B. La preparación de la Forma B se describió anteriormente.

Este material tuvo un punto de fusión de 172.5°C (inicio).

15 En otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para realizar la Forma B del Ejemplo 3 precipitando una muestra del Ejemplo 3 en acetonitrilo. En otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para realizar la Forma B del Ejemplo 3 a partir de una solución de la Forma C del Ejemplo 3 en MIBK.

**Diez picos de difracción de polvo de rayos X para la Forma B del Ejemplo 3**

Ángulo 2-Theta (2θ)	% de Intensidad
5.8	100.0
10.9	59.8
11.5	33.8
25.9	18.2
17.3	15.8
24.0	14.1
19.1	13.4
12.9	11.7
24.7	11.1
27.2	9.7

La XRPD de la Forma B del Ejemplo 3 se muestra en la figura 5.

El análisis por DSC del Ejemplo 3 Forma B muestra una endotermia de fusión con un inicio de 172.5°C y un pico a 174.2°C (Figura 6).

20 De esta forma, el análisis por DSC muestra que el Ejemplo 3 B es un sólido con un punto de fusión alto con un inicio a aproximadamente 172.5°C y un pico a aproximadamente 174.2°C.

El Ejemplo 3 también puede existir en una tercera forma cristalina, a la que se hace referencia en la presente como Forma C. Un proceso para realizar el material de la Forma C a partir de, por ej., el material de la Forma B se describió anteriormente, mediante cristalización a partir de alcohol isopropílico (IPA).

25 Por lo tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona un proceso para realizar la Forma C del Ejemplo 3 cristalizando el Ejemplo 3 a partir de IPA.

La Forma C del Ejemplo 3 se caracteriza por proporcionar al menos uno de los siguientes valores 2θ medidos usando radiación CuKα: 6.9 y 12.3. La Forma C del Ejemplo 3 se caracteriza por proporcionar un patrón de difracción de polvo

de rayos X básicamente como se muestra en la Figura A. Diez picos de difracción de polvo de rayos X se muestran a continuación:

**Diez picos de difracción de polvo de rayos X para la Forma C del Ejemplo 3**

Ángulo 2-Theta (2θ)	% de Intensidad
6.9	40.1
12.3	100.0
10.5	23.8
21.0	67.9
24.6	36.1
13.6	21.4
16.4	19.9
19.6	18.1
20.2	17.5
22.5	18.4

5 El análisis por DSC de la Forma C del Ejemplo 3 muestra una endotermia de fusión con un inicio de 183.0°C y un pico a 185.6°C (Figura B).

De esta forma, el análisis por DSC muestra que la Forma C del Ejemplo 3 es un sólido con un punto de fusión alto con un inicio a aproximadamente 183.0°C y un pico a aproximadamente 185.6°C.

Detalles de las técnicas utilizadas para formar el análisis de la Forma C

Difracción de polvo de rayos X

10 Instrumento analítico: Panalytical Cubix.

El difractograma de polvo de rayos X se determinó colocando una muestra del material cristalino sobre un soporte para obleas de cristal de silicio simple (SSC) Panalytical y esparciendo la muestra en una capa fina con la ayuda de un portaobjetos de microscopio. La muestra se hizo girar a 30 revoluciones por minuto (para mejorar la estadística de los recuentos) y se irradió con rayos X generados por un tubo de foco fino largo de cobre operado a 45kV y 40mA con una longitud de onda de 1.5418 angstroms. El haz de rayos X se pasó por un kit de rendijas Soller de 0.04rad, luego por una rendija de divergencia variable automática fijada en 20mm y finalmente una máscara de haz de 20mm. La radiación reflejada se dirigió a través de una rendija antidispersión de 20mm y una rendija Soller de 0.04rad. La muestra se expuso durante 1.905 segundos por incremento de 0.0025067° 2-theta (modo de escaneo continuo) en el rango de 2 a 40 grados 2-theta en modo theta-theta. El instrumento se equipó con un detector X-Celerator. El control y la captura de datos se realizaron por medio de una estación de trabajo Dell Pentium 4HT con el software X'Pert. Los expertos en la técnica de difracción de polvo de rayos X se darán cuenta de que la intensidad relativa de los picos puede verse afectada, por ejemplo, por granos por encima de los 30 micrones de tamaño y relaciones de aspecto no unitarias, los cuales pueden afectar el análisis de las muestras. El experto también se dará cuenta de que la posición de las reflexiones puede verse afectada por la altura precisa a la que se encuentra la muestra en el difractómetro y la calibración de cero del difractómetro. La superficie plana de la muestra también puede influir de manera leve. Por lo tanto, los datos de los patrones de difracción presentados no deben tomarse como valores absolutos.

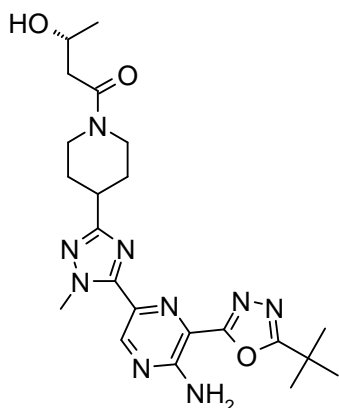
**Calorimetría de barrido diferencial.**

Instrumento analítico: TA Instruments Q1000 DSC.

30 Típicamente, menos de 5 mg de material en un platillo de aluminio estándar equipado con una tapa se calentó en el rango de temperaturas de 25°C a 300°C a una tasa de calentamiento constante de 10°C por minuto. Se utilizó un gas de purga utilizando nitrógeno - tasa de flujo 50 ml por minuto.

**Ejemplo 4**

**(3R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona**

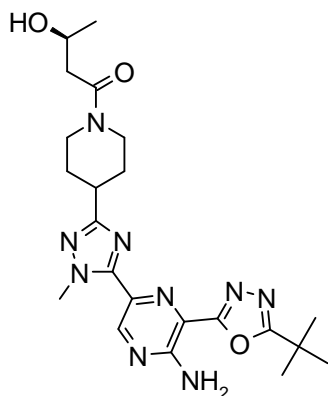


Se agregó 2-(1H-Benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisouronio tetrafluoroborato (201 mg, 0.63 mmol) a una suspensión agitada de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (200 mg, 0.52 mmol, descrita en el Ejemplo 1), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0.273 mL, 1.56 mmol) y ácido (R)-3-hidroxi-  
 5 butanoico (65.2 mg, 0.63 mmol) en N,N-dimetilformamida (3 mL). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla resultante se purificó mediante HPLC preparativa utilizando una columna de fase inversa Waters X-Bridge (C-18, sílice de 5 micrones, 30 mm de diámetro, 150 mm de longitud, tasa de flujo de 60 ml / minuto) utilizando una mezcla isocrática de 31% acetonitrilo en agua (conteniendo carbonato de amonio (2 g/L). Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron hasta secarse para proporcionar un sólido amarillo claro. Este sólido se agitó en acetonitrilo (3 mL) a temperatura ambiente. El sólido resultante se filtró, se lavó con acetonitrilo frío y se secó para proporcionar el compuesto del título (125 mg, 51.0%) como un sólido amarillo claro.

<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

#### 15 **Ejemplo 5**

##### **(3S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-yl]-1-metil-1,2,4-triazol-3-yl]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona**

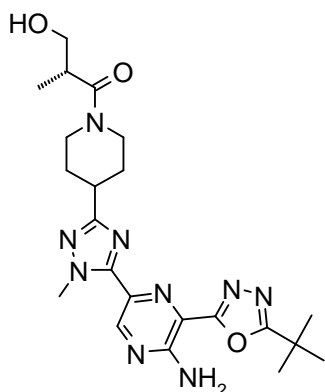


Utilizando un procedimiento similar al del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina con ácido (S)-3-hidroxi-  
 20 butanoico para proporcionar el compuesto del título (167 mg, 68.2%) como un sólido amarillo claro.

<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35 (1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H, m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

#### 25 **Ejemplo 6**

##### **(2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-yl]-1-metil-1,2,4-triazol-3-yl]-1-piperidil]-3-hidroxi-2-metil-propan-1-ona**

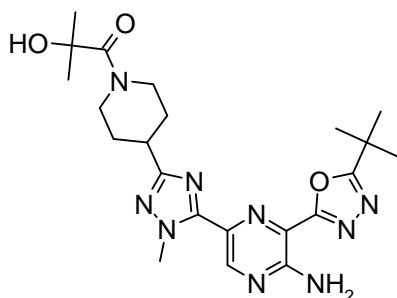


Utilizando un procedimiento similar al del Ejemplo 4, se hizo reaccionar 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina con ácido (R)-3-hidroxi-2-metilpropanoico para proporcionar el compuesto del título (87 mg, 47.4%) como un sólido amarillo claro.

- 5 <sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 1.55 (9H, s), 1.61 (3H, s br), 1.8-2.0 (2H, m), 2.10-2.25 (2H, m), 2.90 (2H, m), 3.10 (1H, m), 3.3 (2H, m), 3.77 (2H, m), 4.33 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.05 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

#### Ejemplo 7

#### 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidroxi-2-metil-propan-1-ona



10

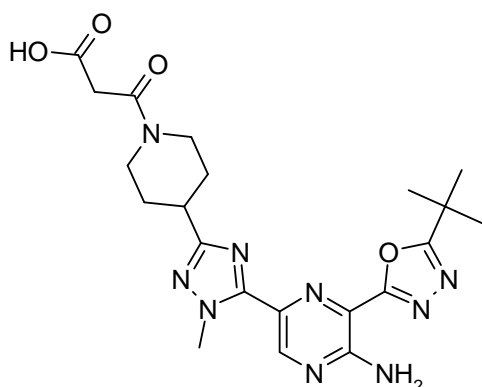
- Se agregó en una porción 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (100 mg, 0.52 mmol) a ácido 2-hidroxi-2-metilpropanoico (38.0 mg, 0.37 mmol), 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0.26 mmol) y N-óxido de 2-hidroxi-piridina (57.9 mg, 0.52 mmol) disuelto en NMP (1.2 mL) bajo argón. La solución resultante se agitó a 25°C durante 3 horas. Se agregó piridina (100 µL, 1.24 mmol) y la mezcla se agitó durante 18 horas. Se agregó 1-óxido de 2-hidroxipiridina adicional (57.9 mg, 0.52 mmol) y 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (100 mg, 0.52 mmol). La mezcla luego se calentó hasta 70°C durante 48 horas, se agregaron más ácido 2-hidroxi-2-metilpropanoico (15 mg, 0.14 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida clorhidrato (50.0 mg, 0.26 mmol) y 1-óxido de 2-hidroxipiridina (25.0 mg, 0.23 mmol) y la mezcla luego se mantuvo a 70°C durante 8 horas. La solución se purificó mediante HPLC preparativa utilizando una columna de fase inversa Waters X-Bridge (C-18, sílice de 5 micrones, 19 mm de diámetro, 100 mm de longitud, tasa de flujo de 40 ml / minuto) y mezclas cada vez menos polares de agua (conteniendo 0.2% carbonato de amonio) y acetonitrilo como eluyente para proporcionar el compuesto del título (71 mg, 58%) como un sólido amarillo claro.
- 15
- 20

<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (CDCl<sub>3</sub>) 1.55 (15H, s br), 1.90 (2H, m), 2.15 (2H, m), 3.05-3.3 (4H, m), 4.32 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

25

#### Ejemplo 8

#### Ácido 3-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-oxo-propanoico

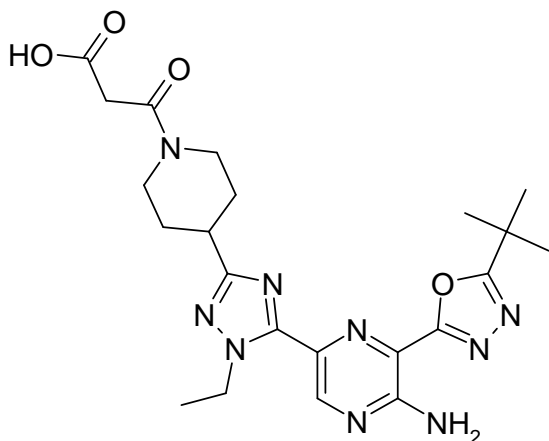


Se agregó gota a gota etil 3-cloro-3-oxopropanoato (0.037 mL, 0.29 mmol) a una solución agitada de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0.26 mmol) y trietilamina (0.047 mL, 0.34 mmol) disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.5 mL) durante un período de 2 minutos a 0°C en nitrógeno. La mezcla se agitó a 0°C durante 10 minutos luego se dejó entibiar hasta alcanzar temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La mezcla se evaporó, se disolvió en DMF; un sólido blanco se retiró mediante filtración y el filtrado se purificó mediante HPLC preparativa utilizando una columna de fase inversa Waters X-Terra eluyendo con una mezcla de agua (conteniendo 0.2% carbonato de amonio) y acetonitrilo para proporcionar etil 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoato (80 mg, 61.7%) como un sólido amarillo. Este material se suspendió en THF (2 mL). Se agregaron hidróxido de sodio 2N (0.235 mL, 0.47 mmol) y agua (0.5 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó a la mezcla ácido clorhídrico 2N (230 µL). Los disolventes se evaporaron. El residuo se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 mL) y agua (5 mL). La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Los disolventes se evaporaron. La espuma resultante se trituró en éter. El sólido amarillo resultante se filtró, se secó, se trituró en acetonitrilo (3 mL). El sólido amarillo se recogió mediante filtración, se secó a 40°C para proporcionar el compuesto del título (50 mg, 68%) como un sólido amarillo.

<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.46 (9H, s), 1.58 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.84 (1H, m), 3.0 (1H, m), 3.21 (1H, m), 3.46 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.22 (3H, s), 4.34 (1H, m), 7.8-8.2 (1H, m), 8.87 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 470.

### Ejemplo 9

**Ácido 3-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-oxopropanoico**



Se agregó hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (474 mg, 1.25 mmol) durante 30 segundos en porciones a una solución agitada de ácido 3-etoxi-3-oxopropanoico (150 mg, 1.13 mmol), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0.394 mL, 2.26 mmol) y 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (450 mg, 1.13 mmol) disuelta en DMF (20 mL) a 50°C. Se tomaron muestras de la solución resultante después de 1 min (reacción completa) e inmediatamente se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y se diluyó con EtOAc (100 mL) y se lavó secuencialmente con agua (20 mL) y salmuera saturada (20 mL). La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó para proporcionar etil 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoato bruto (850 mg).

Parte de dicho material (780 mg) se disolvió en THF (20 ml). A esta solución se agregó hidróxido de sodio acuoso 2N

(2.3 ml, 4.57 mmol) y agua (5 ml) y luego metanol (5 ml) para proporcionar una solución clara. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. El THF se evaporó. La capa acuosa se acidificó hasta alcanzar pH3 con ácido clorhídrico acuoso 2N (2.5 ml). Se agregó diclorometano (50 ml) y la fase orgánica se extrajo. La fase orgánica se lavó con salmuera (10 ml) y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Los disolventes se evaporaron. La goma resultante se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters X-Bridge Prep C18 OBD, 5 μ sílice, 50 mm de diámetro, 100 mm de longitud), utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (conteniendo 1% amoníaco) y acetonitrilo como eluyentes. Las fracciones conteniendo el compuesto deseado se evaporaron hasta secarse para proporcionar sal de amonio pura. Esto se solubilizó en agua y se acidificó hasta alcanzar pH3 con ácido clorhídrico 2N (~ 0.3 ml). Se agregó diclorometano (50 ml) y la fase orgánica se separó, se lavó con salmuera (5 ml) y se secó sobre MgSO<sub>4</sub>. Después de la filtración la solución resultante se evaporó hasta secarse y el residuo se trituró con éter dietílico (5 ml) y se filtró para proporcionar ácido 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoico (195 mg, 26.5%) como un sólido crema.

<sup>1</sup>H Espectro de NMR: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 1.48 (3H, m), 1.55 - 1.62 (1H, m), 1.70 - 1.80 (1H, m), 1.95 - 2.05 (2H, m), 2.80 - 2.90 (1H, m), 2.95 - 3.05 (1H, m), 3.15 - 3.25 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.78 - 3.85 (1H, m), 4.30 - 4.40 (1H, m), 4.55 - 4.65 (2H, m), 7.80 - 8.00 (2H, br s), 8.88 (1H, s), 12.60 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 484.

**Ejemplo 10: (2S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2,3-dihidroxi-propan-1-ona**

A una mezcla de 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (257 mg, 0.50 mmol, sal de TFA), (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de potasio (101 mg, 0.55 mmol) y EDCI (105 mg, 0.55 mmol) en DCM (5 mL) se agregaron hidrato de 1-hidroxi-1H-benzotriazol (85 mg, 0.56 mmol) y DIPEA (194 mg, 1.50 mmol). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Se agregó agua a la mezcla y la mezcla se extrajo con DCM. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron para obtener (S)-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanona (320 mg). Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 526. Se agregó TFA (1.6 ml, 20.77 mmol) gota a gota a una mezcla de (S)-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)metanona (320 mg) en DCM (10 mL) a t.a. La mezcla se agitó durante 16 h a t.a., se concentró y se purificó mediante HPLC preparativa (columna Waters XBridge Prep C18 OBD, sílice de 5 μ, 19 mm de diámetro, 100 mm de longitud) utilizando mezclas cada vez menos polares de agua (que contenía 0.1% de NH<sub>3</sub>) y MeCN como eluyente. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se evaporaron a sequedad para proporcionar el compuesto del título (142 mg, 48%) como un sólido blanco. <sup>1</sup>H Espectro de NMR (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.56 (1H, m), 1.70 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 486.

**Ejemplo 11: (2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2,3-dihidroxi-propan-1-ona**

Se hizo reaccionar 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina con (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de potasio, utilizando un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 10 para proporcionar el compuesto del título (0.145 g, 40%) como un sólido. <sup>1</sup>H Espectro de NMR (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.60 (2H, m), 1.98 (2H, m), 2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.17 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H, s); Espectro de masa [M+H]<sup>+</sup> = 486.

**Breve Descripción de las Figuras**

- La Figura 1 muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X para la Forma A del Ejemplo 1.
- La Figura 2 muestra un termograma por DSC para la Forma A del Ejemplo 1.
- La Figura 3 muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X para la Forma A del Ejemplo 3.
- La Figura 4 muestra un termograma por DSC para la Forma A del Ejemplo 3.
- La Figura 5 muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X para la Forma B del Ejemplo 3.
- La Figura 6 muestra un termograma por DSC para la Forma B del Ejemplo 3.
- La Figura 7 muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X para la Forma C del Ejemplo 3.
- La Figura 8 muestra un termograma por DSC para la Forma C del Ejemplo 3.
- La Figura 9 muestra la inhibición del crecimiento tumoral mediante administración secuencial del Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de AKT (AZD5363).



La Figura 10 muestra la inhibición del crecimiento tumoral mediante co-administración del Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de AKT (AZD5363).

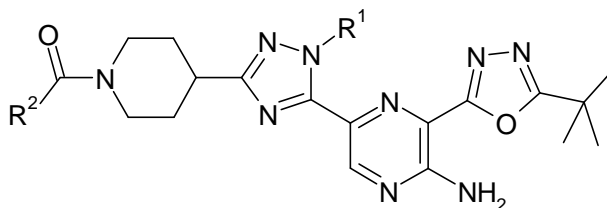
La Figura 11 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PARP (Olaparib) en modelo de xenoinjerto BT474.

5 La Figura 12 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PARP (Olaparib) en modelo de xenoinjerto MCF7.

La Figura 13 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con (AZD8186).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I)



(I)

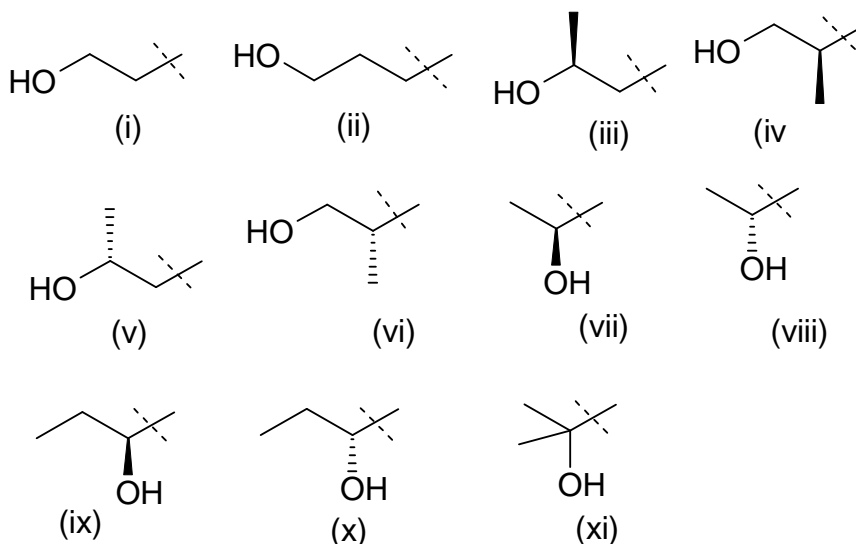
5 en donde

R<sup>1</sup> es metilo o etilo; y

R<sup>2</sup> es alquilo(C2-3) sustituido por hidroxi;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. Un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>2</sup> se selecciona de los grupos (i) a (xi):



3. Un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>2</sup> se selecciona de los grupos (i) a (vi) tal como se define en la reivindicación 2.

15 4. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>2</sup> es el grupo (i) tal como se define en la reivindicación 2.

5. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>1</sup> es metilo.

6. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R<sup>1</sup> es etilo.

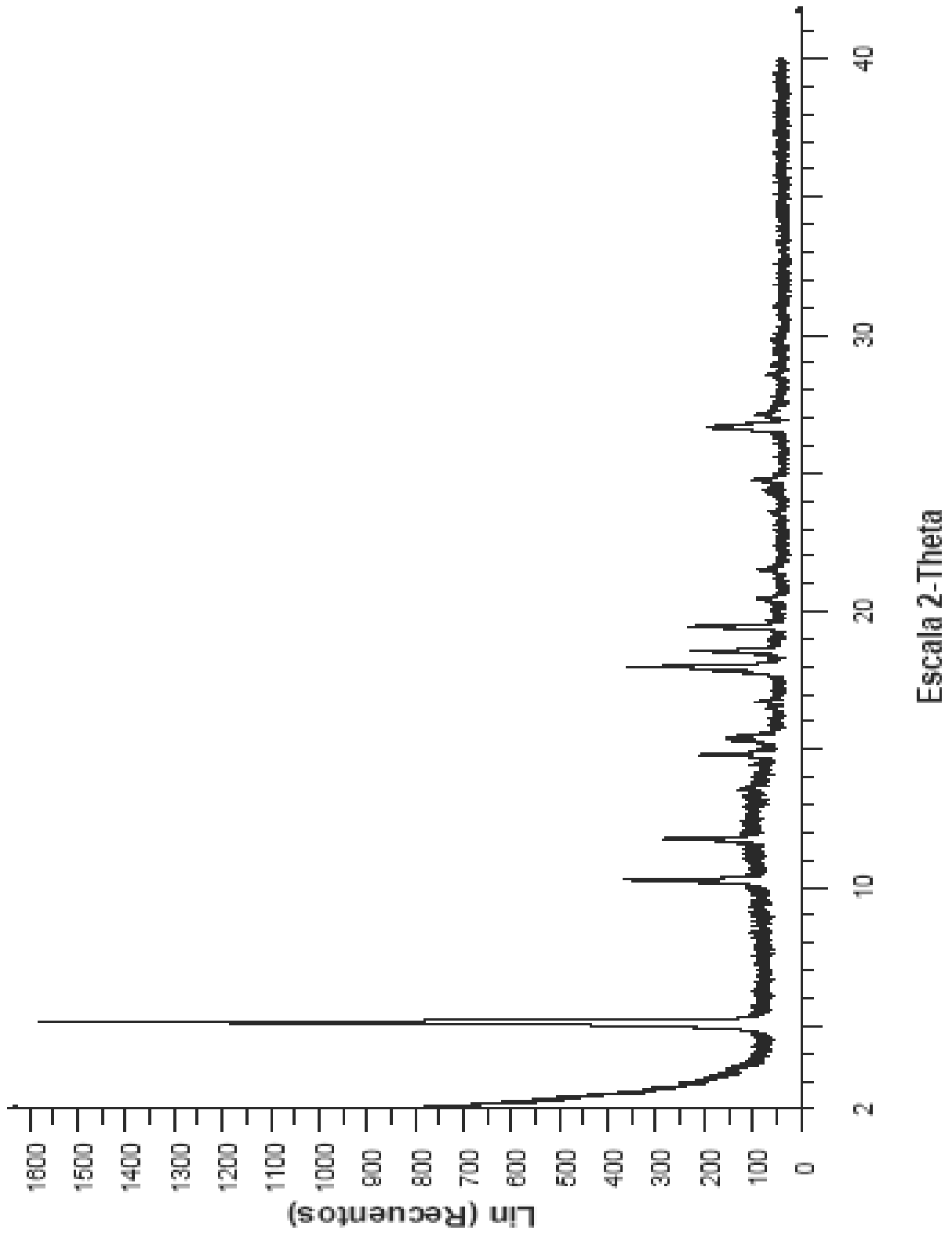
20 7. Un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionándose dicho compuesto de:

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona;

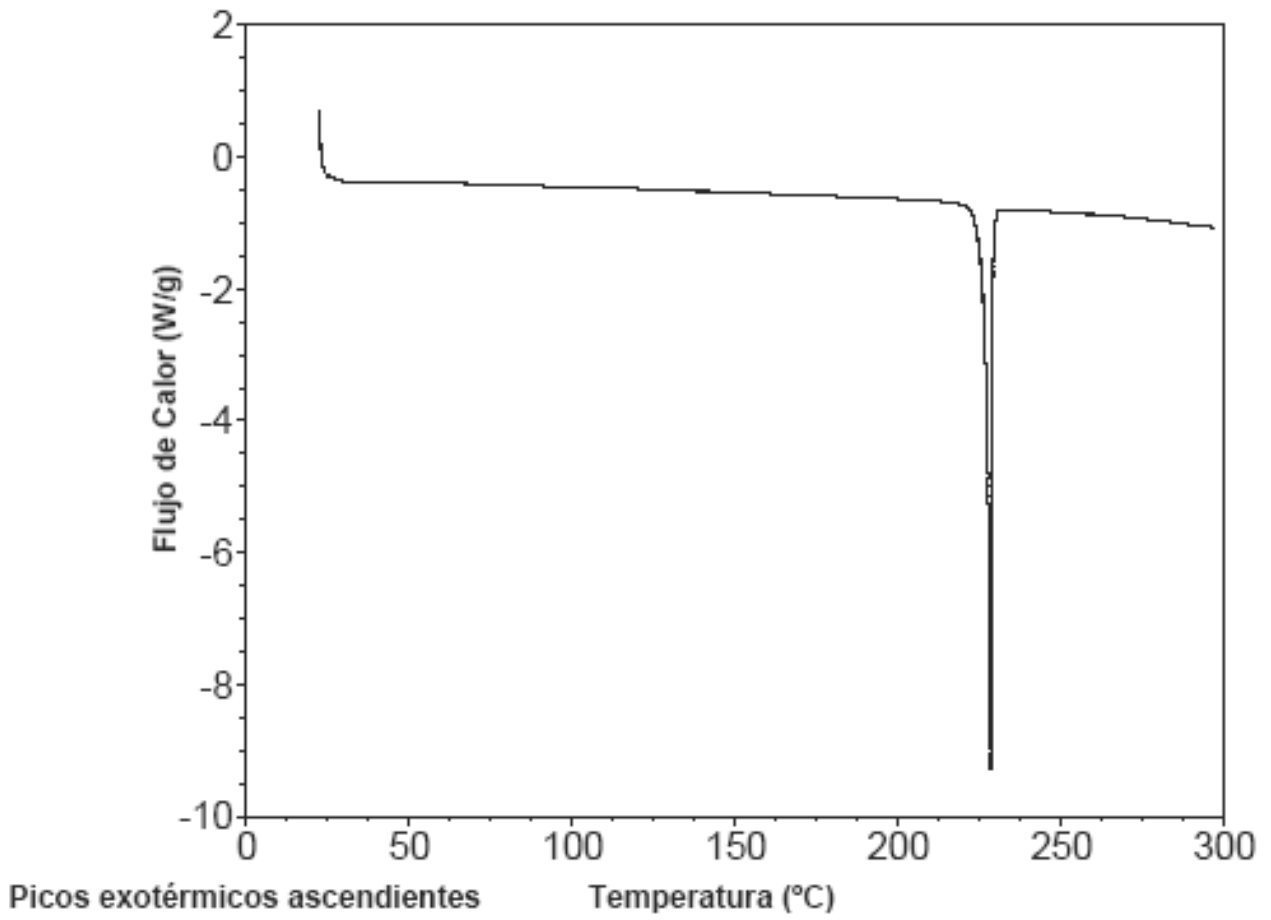
1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona;

25 (3R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona;

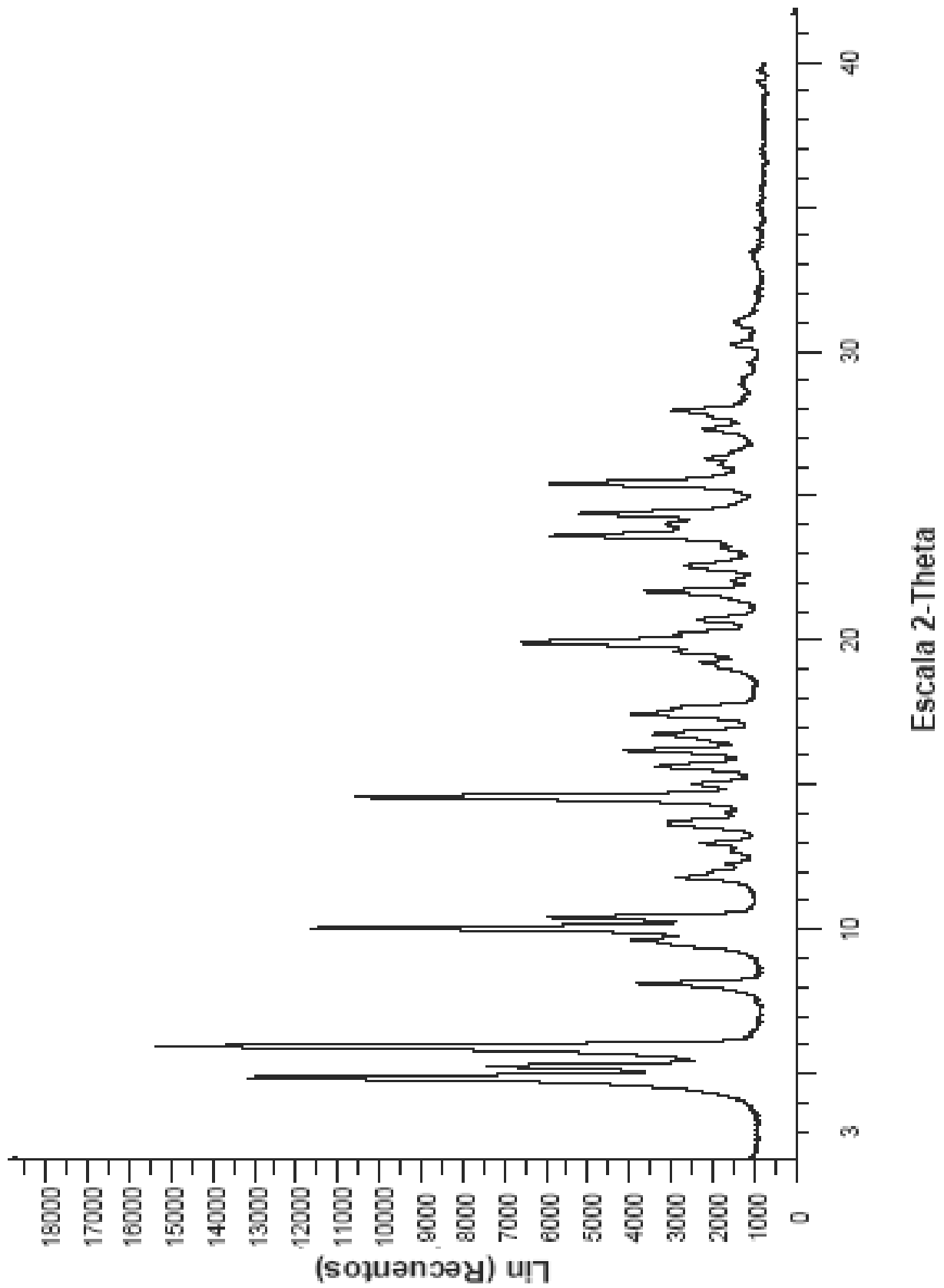
- (3S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-butan-1-ona;
- (2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-2-metil-propan-1-ona;
- 5 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidroxi-2-metil-propan-1-ona.
8. Un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, el cual es 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 10 9. Un compuesto tal como se reivindica en la reivindicación 1, el cual es 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona.
10. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en una forma cristalina.
- 15 11. Una forma cristalina de 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
12. Una forma cristalina tal como se reivindica en la reivindicación 11, la cual es la Forma A de 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 4.8^\circ$  y  $10.0^\circ$ .
- 20 13. Una forma cristalina tal como se reivindica en la reivindicación 11, la cual es la Forma B de 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 5.8^\circ$  y  $10.9^\circ$ .
14. Una forma cristalina tal como se reivindica en la reivindicación 11, la cual es la Forma C de 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona, que tiene un patrón de difracción de polvo de rayos X con al menos dos picos específicos a aproximadamente  $2\text{-theta} = 6.9^\circ$  y  $12.3^\circ$ .
- 25 15. Un compuesto tal como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso como un medicamento.
16. Un compuesto de Fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer en un animal de sangre caliente tal como el hombre.
- 30 17. Un compuesto de Fórmula (I) para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer tal como se reivindica en la reivindicación 16, el cual es 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidroxi-propan-1-ona o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
18. Un compuesto de Fórmula (I) para su uso en la prevención o el tratamiento de cáncer tal como se reivindica en la reivindicación 16, en donde el cáncer es cáncer de mama.
- 35 19. Una combinación adecuada para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende un compuesto de Fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y otro agente antitumoral.
20. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de Fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tal como se reivindica en la reivindicación 1 y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 21. Un compuesto de Fórmula (I) para su uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer, en donde el paciente se selecciona para el tratamiento con un compuesto de Fórmula (I) si se ha proporcionado una muestra del paciente que contiene ADN derivado de tumor o células tumorales y se ha determinado que el gen PIK3CA en las células tumorales o ADN derivado de tumor del paciente es de tipo salvaje o mutante.
- 45 22. Un compuesto de Fórmula (I) tal como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cánceres con células tumorales identificadas por albergar un gen PIK3CA mutante.



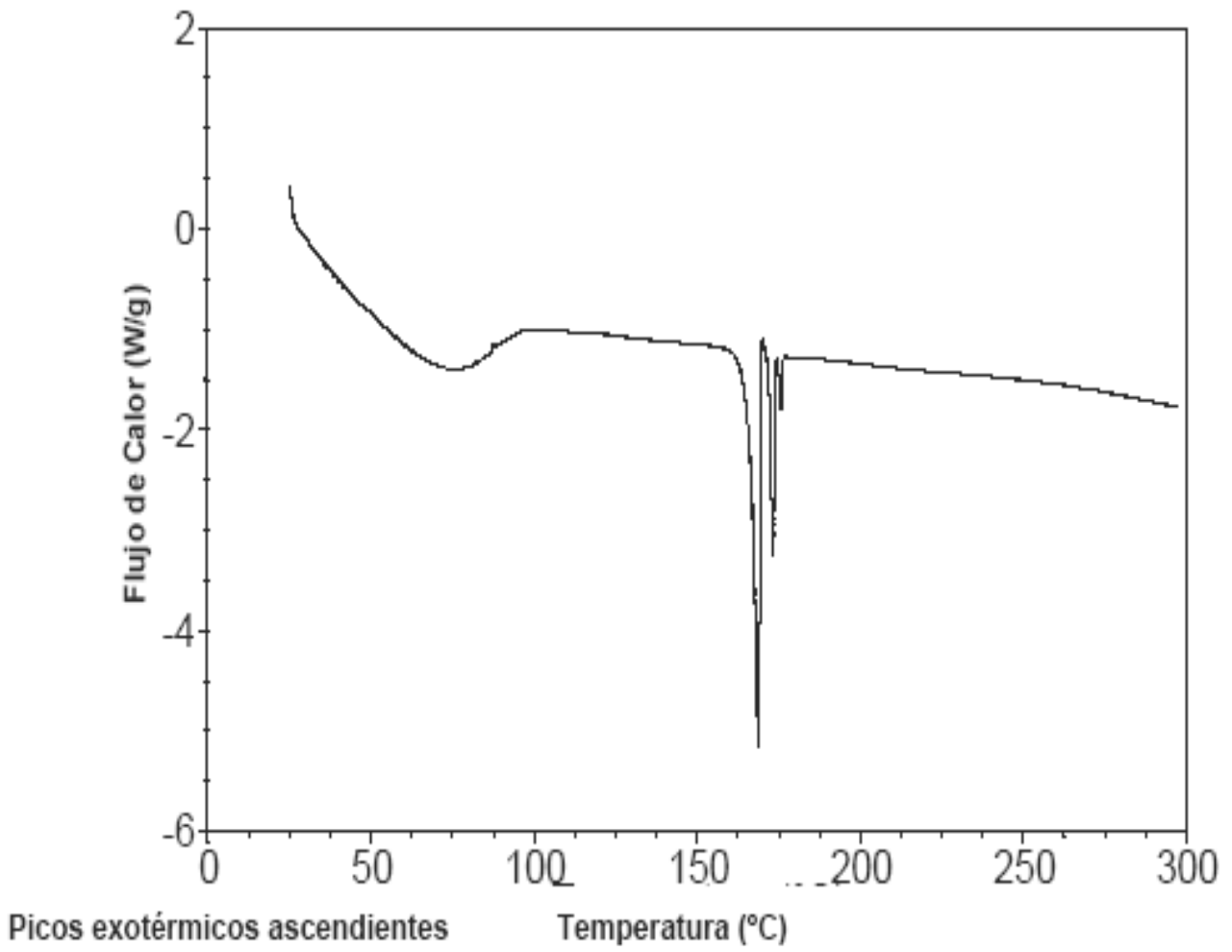
**Figura 1:** Patrón de Difracción de Polvo de Rayos X, Ejemplo 1, Forma A



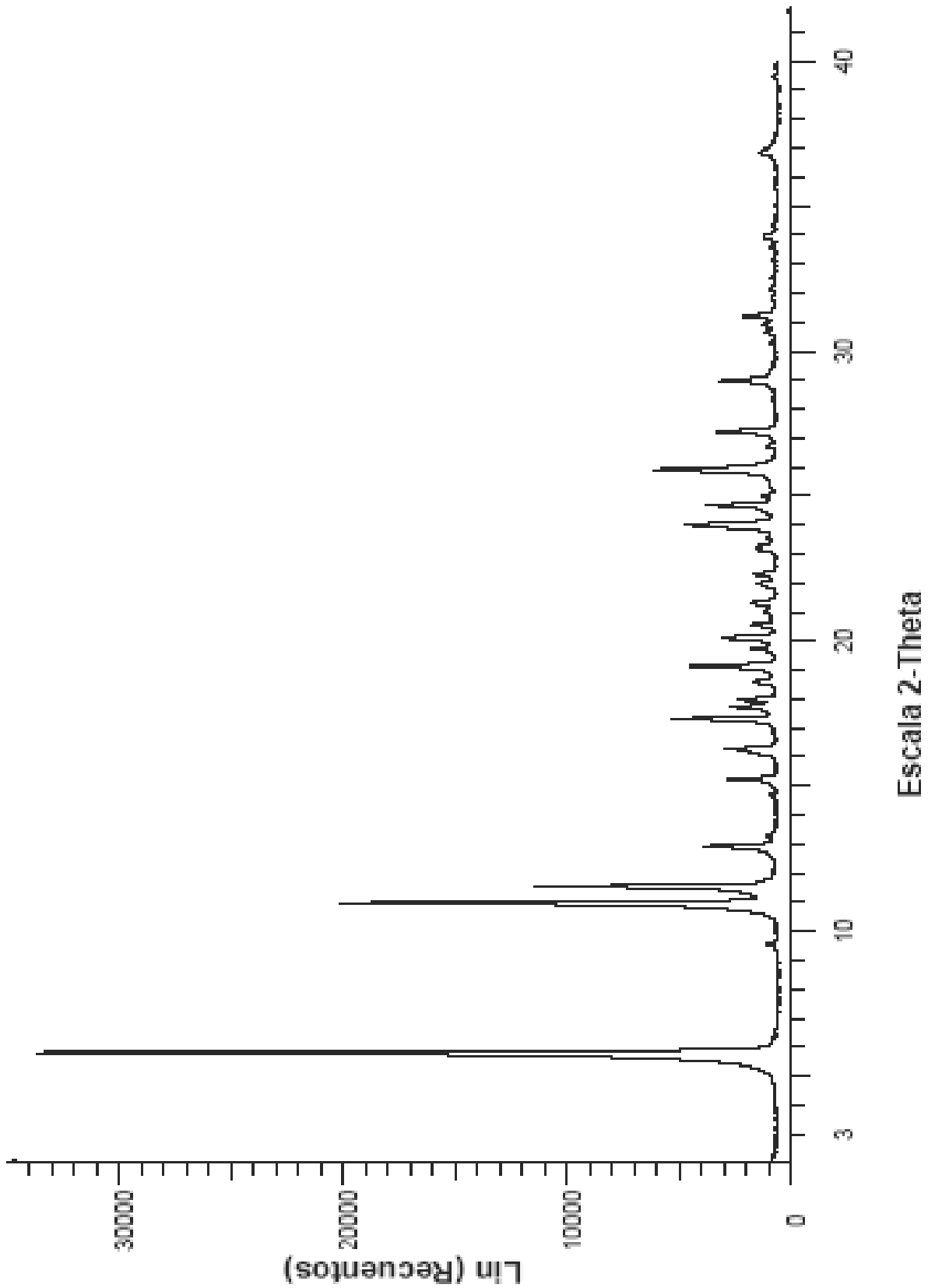
**Figura 2:** Termograma de DSC, Ejemplo 1, Forma A



**Figura 3:** Patrón de Difracción de Polvo de Rayos X, Ejemplo 3, Forma A

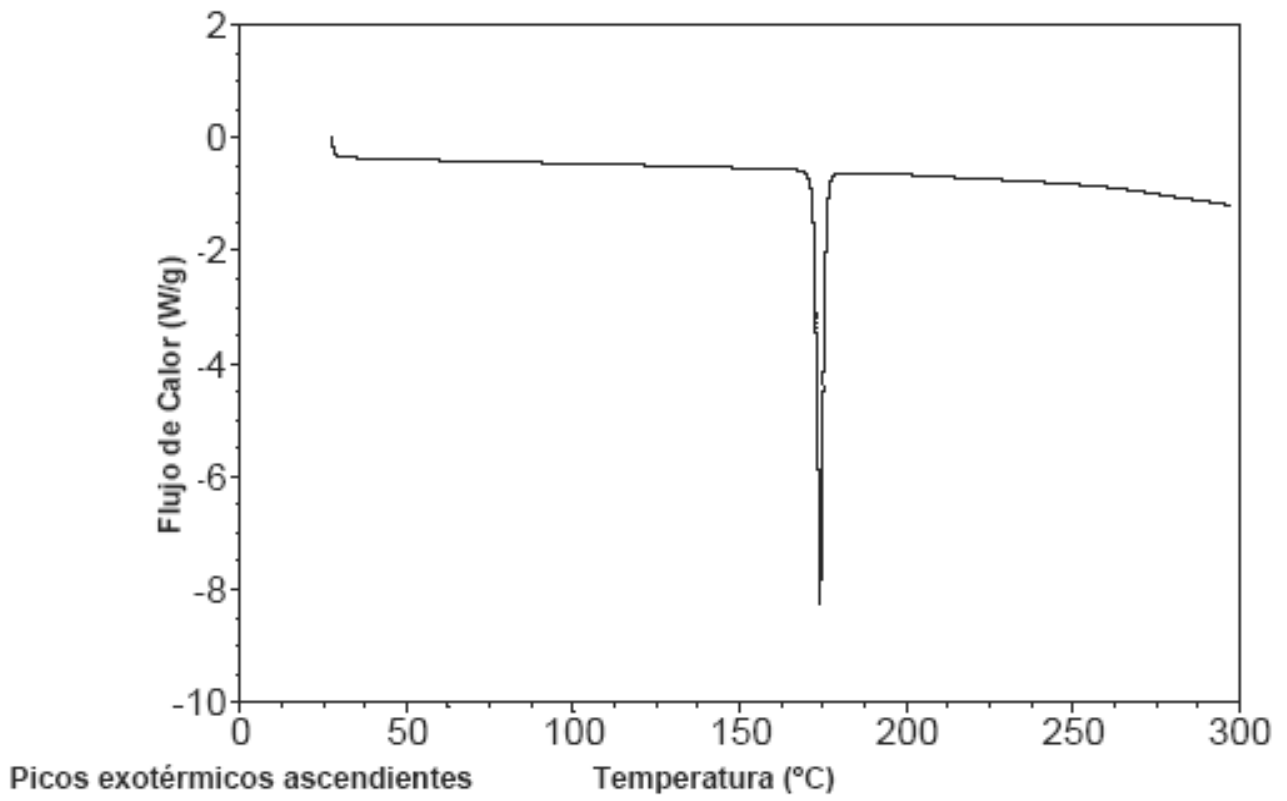


**Figura 4:** Termograma de DSC, Ejemplo 3, Forma A

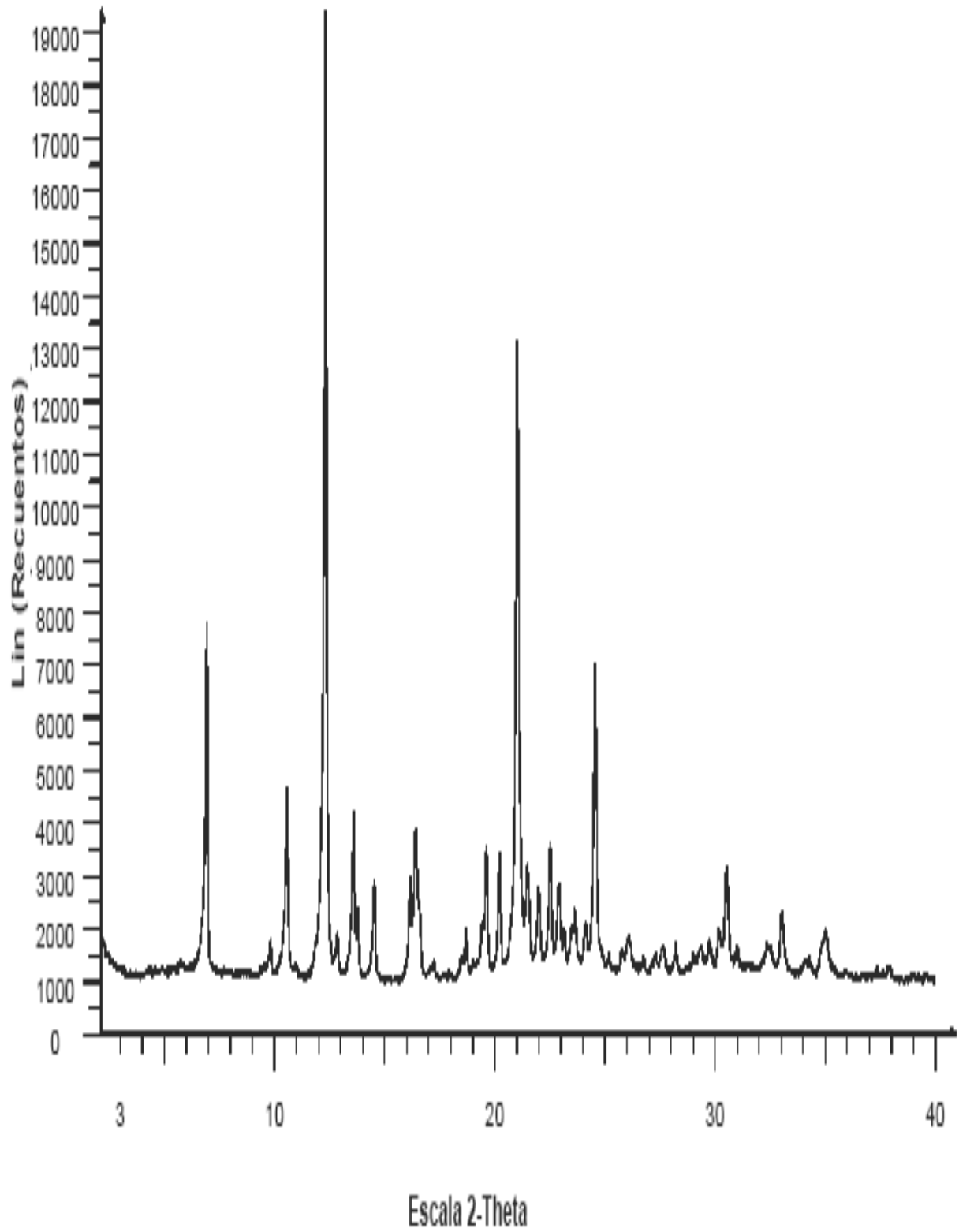


**Figura 5:** Patrón de Difracción de Polvo de Rayos X, Ejemplo 3, Forma B

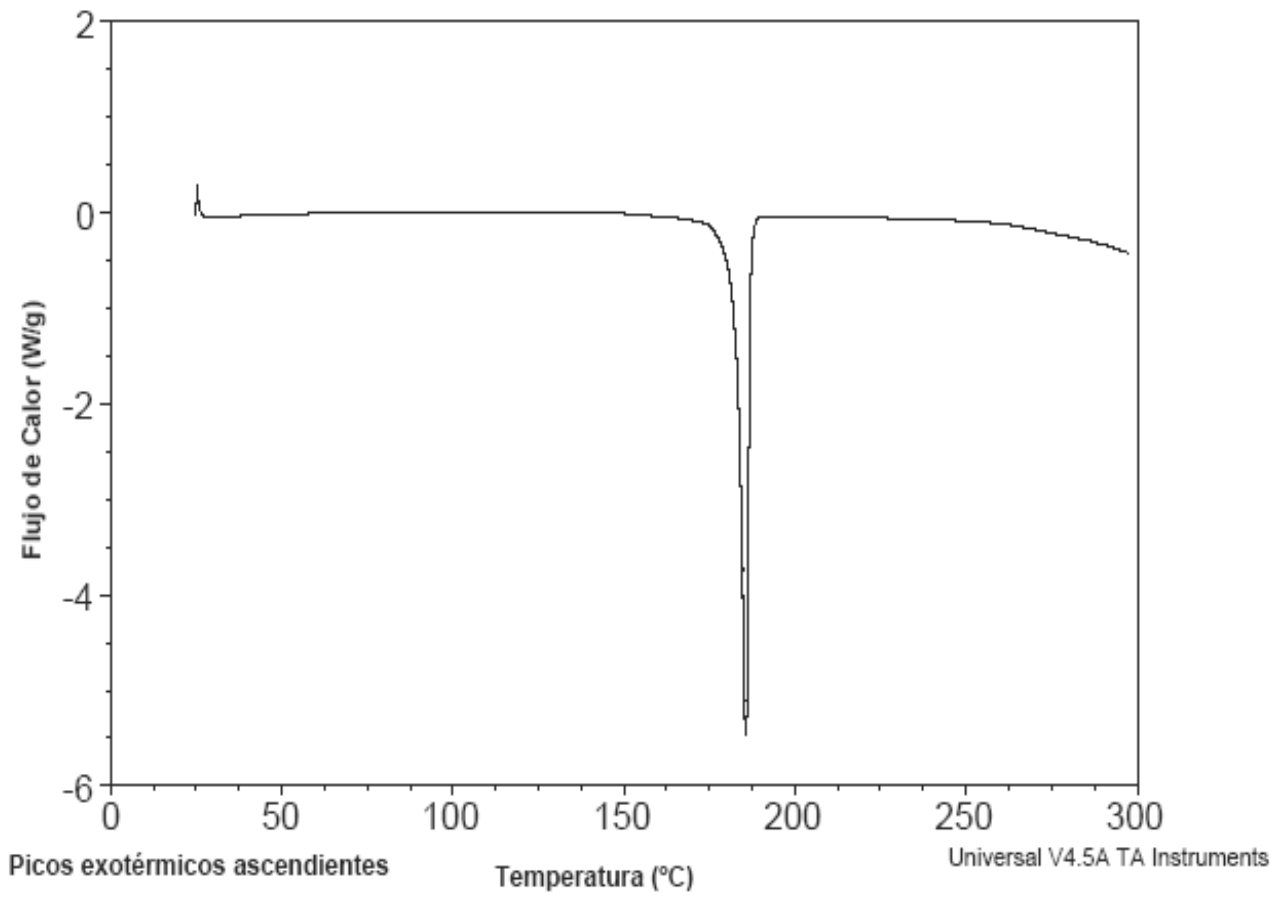




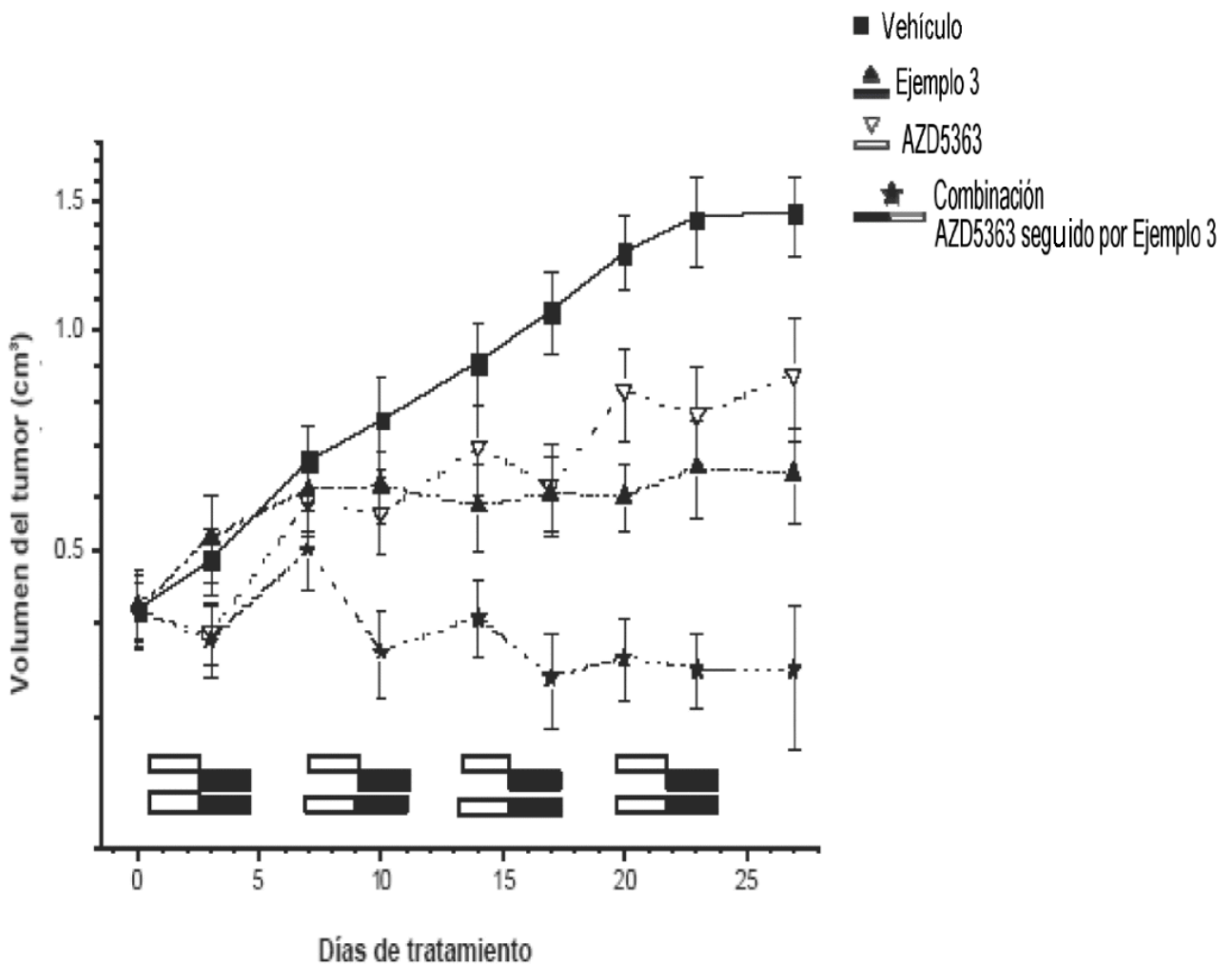
**Figura 6:** Termograma de DSC, Ejemplo 3, Forma B



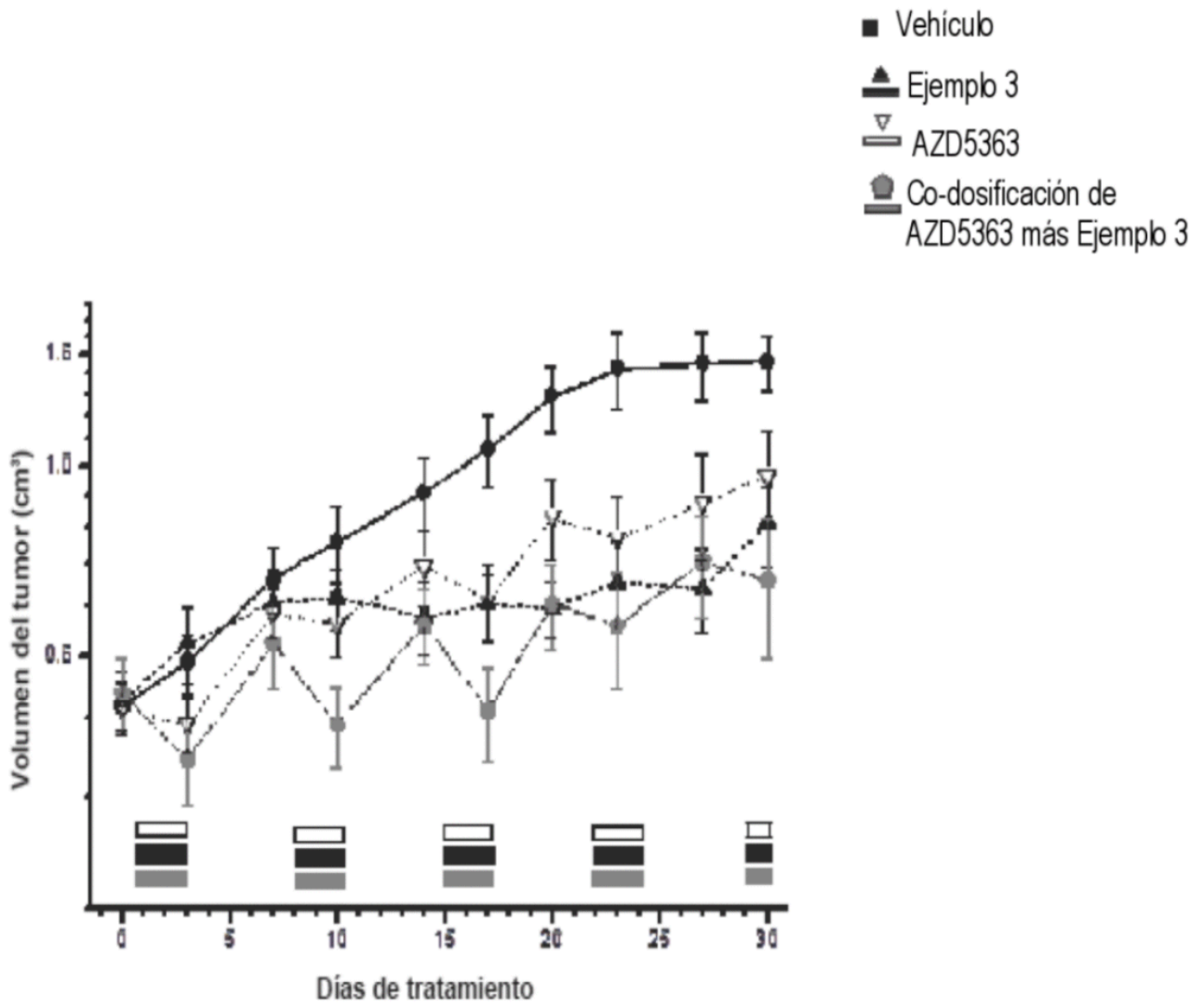
**Figura 7:** Patrón de Difracción de Polvo de Rayos X, Ejemplo 3, Forma C



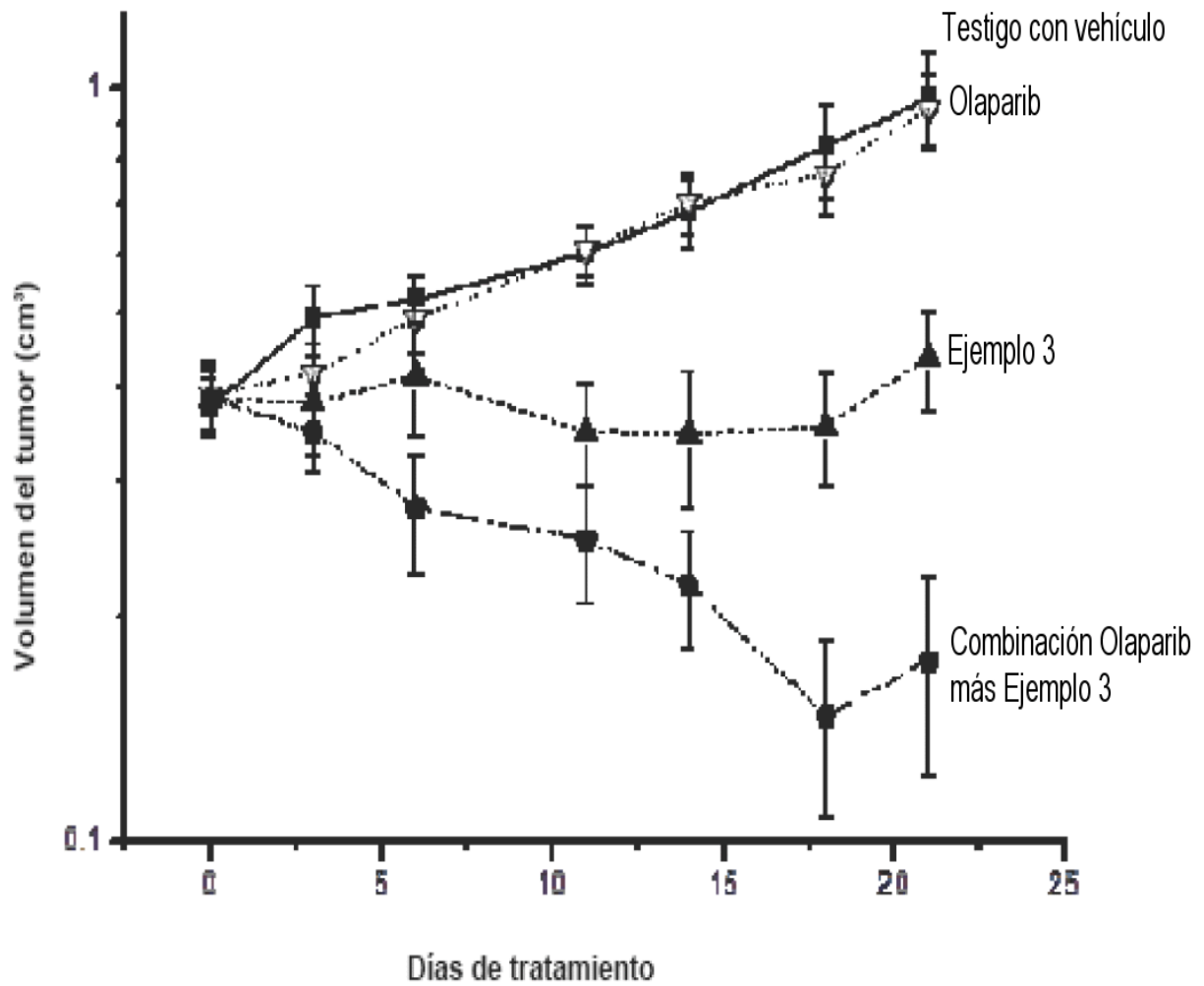
**Figura 8:** Termograma de DSC, Ejemplo 3, Forma C



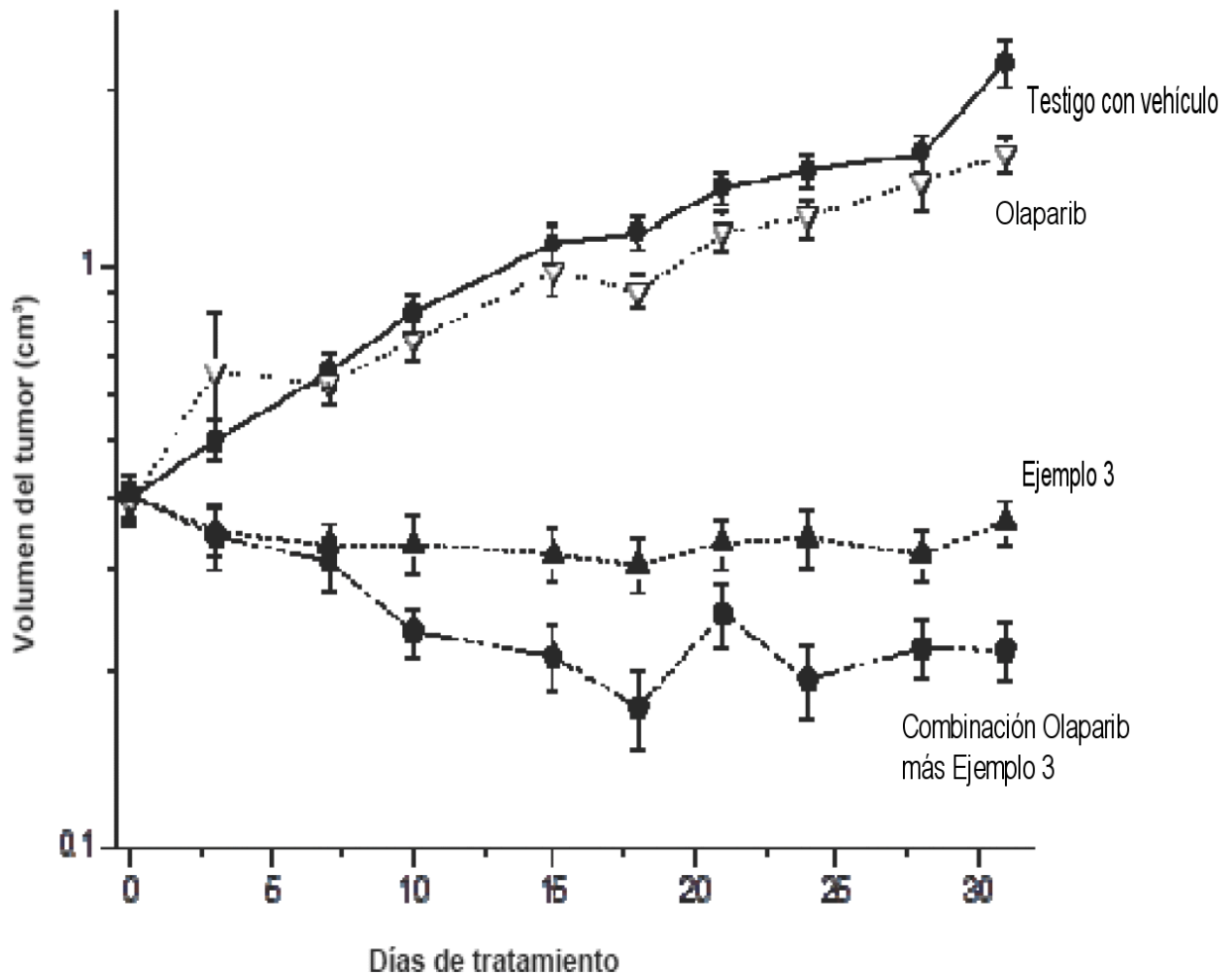
**Figura 9: Inhibición del Crecimiento tumoral mediante administración secuencial del Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de AKT (AZD5363)**



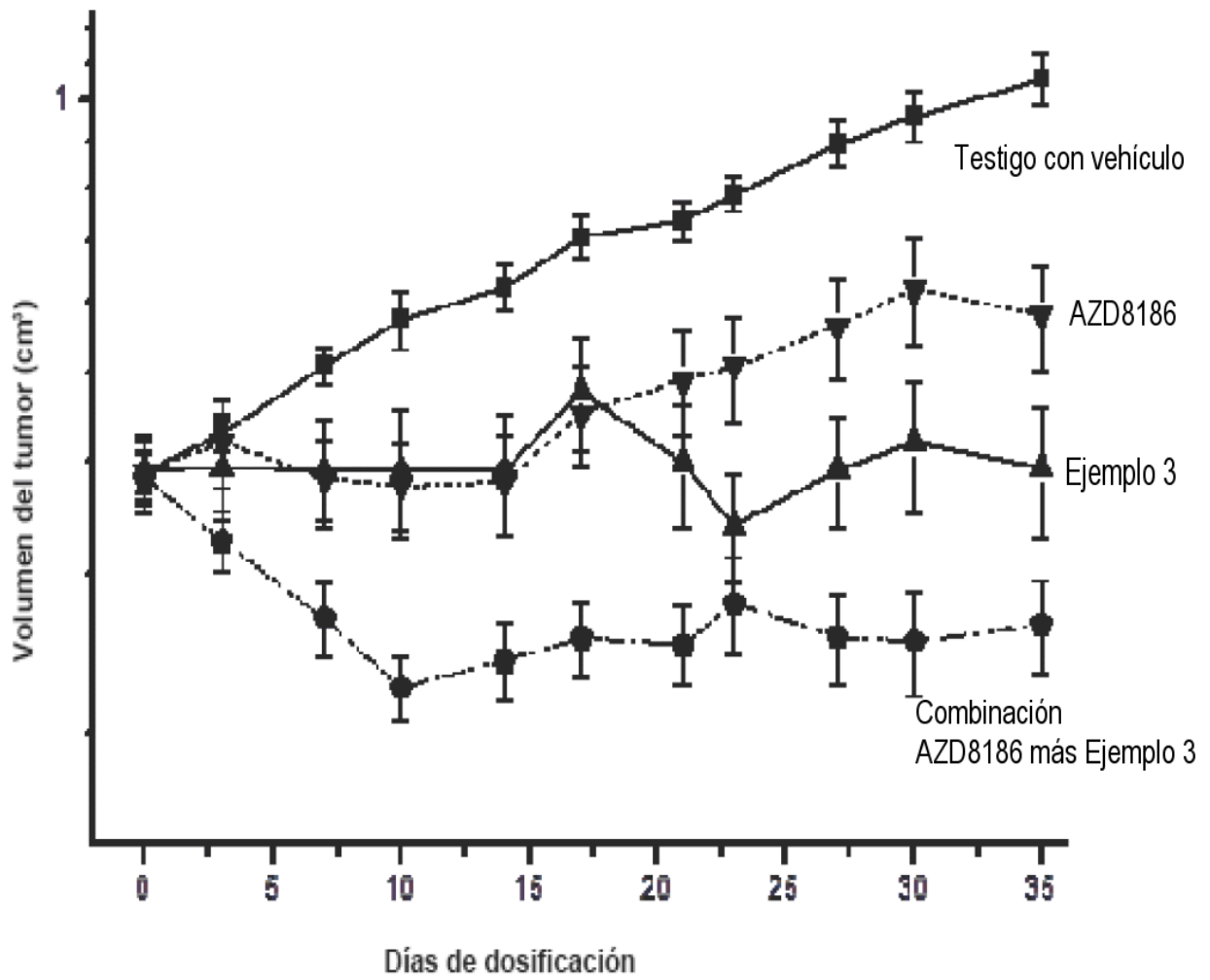
**Figura 10: Inhibición del crecimiento tumoral mediante co-administración del Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de AKT (AZD5363)**



**Figura 11: Inhibición del Crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PARP (Olaparib) en modelo de xenoinjerto BT474**



**Figura 12: Inhibición del Crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con el inhibidor de PARP (Olaparib) en modelo de xenoinjerto MCF7**



**Figura 13: Inhibición del crecimiento tumoral por el Ejemplo 3 en combinación con (AZD8186)**