

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 770**

51 Int. Cl.:

A61K 31/497 (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/517 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2016** **PCT/US2016/058255**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017** **WO17070565**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2016** **E 16788389 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 3364971**

54 Título: **Inhibidores de PDK1 heterocíclicos para uso para tratar cáncer**

30 Prioridad:

23.10.2015 US 201562245606 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2021

73 Titular/es:

SUNESIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
395 Oyster Point Blvd., Suite 400
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

HANSEN, STIG K. y
BINNERTS, MINKE E.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 820 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de PDK1 heterocíclicos para uso para tratar cáncer

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional U.S. n.º 62/245.606, presentada el 23 de octubre de 2015.

ANTECEDENTES

La proteína cinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositida (PDK1, también conocida como PDK1) es una cinasa maestra que activa otras cinasas importantes en el crecimiento y supervivencia celulares, incluyendo los miembros de las familias Akt (proteína cinasa B), PKC, RSK (S6K), y SGK. PDK1 activa cinasas sustrato mediante la activación de la fosforilación del bucle T (Belham et al., Curr. Biol., 1999, 9:R93-R96).

PDK1 es una proteína de 556 aminoácidos que consta de un dominio de cinasa N-terminal (catalítico) y un dominio de homología de pleckstrina (PH) C-terminal. El dominio de PH interactúa con el fosfatidilinositol (PI) (3,4)-bisfosfato y fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato, contribuyendo a la localización y activación de ciertos sustratos de PDK1, incluyendo en particular Akt. Se cree que la activación de Akt requiere una orientación adecuada de los dominios de cinasa y de PH de PDK1 y Akt en la membrana. Se sabe que Akt está asociada con cánceres (Manning et al., Cell, 2007, 129(7):1261-1274), y con frecuencia está mutada o hiperactivada en cánceres humanos.

Sin embargo, aunque PDK1 puede interactuar con algunos de sus sustratos a través de este mecanismo dependiente de PI (mediado por PH), puede interactuar con otros sustratos a través de un mecanismo distinto independiente de PI. El dominio de cinasa N-terminal tiene tres sitios de unión al ligando; un sitio de unión al sustrato, un sitio de unión a ATP, y un sitio de acoplamiento (también conocido como bolsillo de PIF) para la interacción con los sustratos. Este sitio de acoplamiento se conoce como el "bolsillo de PIF", en referencia a su unión a una región de la cinasa 2 relacionada con la proteína cinasa C (PRK2), denominada fragmento de interacción con PDK1 (PIF) (Biondi et al., EMBO J., 2000, 19(5):979-988). Varios sustratos de PDK1, incluyendo S6K y proteína cinasa C, requieren la unión a este sitio de acoplamiento del bolsillo de PIF.

Como se señaló, PDK1 es importante para regular la actividad de otras cinasas. Las principales dianas de PDK1 son la subfamilia AGC de proteínas cinasas (Alessi et al., Biochem. Soc. Trans., 2001, 29(2):1-14), tales como las isoformas de la proteína cinasa B (PKB, también conocida como Akt), la p70 ribosómica S6 cinasa (S6K) (Avruch et al., Prog. Mol. Subcell. Biol., 2001, 26:115), las p90 ribosómicas S6 cinasas (RSK1-4) (Frodin et al., EMBO J., 2000, 19:2924-2934), IKK y miembros de la familia de la proteína cinasa C (PKC) (Le Good et al., Science, 1998, 281:2042-2045). La señalización mediada por PDK1 aumenta en respuesta a insulina, factores de crecimiento y la unión a las células de la matriz extracelular (señalización de la integrina), lo que da como resultado diversos sucesos celulares tales como la supervivencia, el crecimiento, la proliferación, y la regulación de la glucosa (Lawlor et al., J. Cell Sci., 2001, 114:2903-2910; Lawlor et al., EMBO J., 2002, 21:3728-3738). De los varios sustratos de PDK1 mencionados anteriormente, se ha centrado mucha atención en AKT. El desarrollo de inhibidores de AKT potentes y selectivos ha sido un desafío, y solo dos compuestos han llegado al desarrollo clínico: AZD5363 y MK2206. Estos compuestos han mostrado una actividad anticancerosa prometedora en ciertos tipos de tumores. Sin embargo, estudios más recientes que usan estos compuestos han revelado, sorprendentemente, que muchos tipos de tumores no son sensibles a la inhibición de AKT, o expresan poca o ninguna AKT activada.

PDK1 es la única cinasa conocida que fosforila Thr306 en el bucle de activación de AKT, que es fundamental para la activación de AKT cinasa. De este modo, PDK1 desempeña un papel fundamental en la activación de AKT. Los esfuerzos para desarrollar inhibidores de PDK1 potentes y selectivos con propiedades similares a fármacos adecuados no han tenido éxito, y ningún compuesto ha entrado en desarrollo clínico. Los estudios preclínicos dados a conocer con inhibidores de PDK1 GSK2334470 y BX-320/-795 han mostrado una eficacia moderada y, de este modo, se ha propuesto que PDK1 puede no limitar la velocidad en la promoción del crecimiento de células cancerosas. Alternativamente, estos inhibidores pueden tener propiedades farmacológicas deficientes, al no lograr una inhibición suficiente para producir un efecto, o las células cancerosas usadas no dependían de PDK1 para el crecimiento.

La fosfatasa supresora de tumores con homología de tensina (PTEN) es un importante regulador negativo de la ruta de señalización de supervivencia celular iniciada por la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K). La ruta PDK1/Akt se activa en muchos cánceres a través de mutaciones en las tirosina cinasas receptoras (RTK), Ras, PI-3 cinasa, o PTEN (Cully et al., Nature Reviews Cancer, 2006, 6:184-192). Se ha detectado una activación y señalización elevadas de PDK1 en varios cánceres como resultado de distintos sucesos genéticos, tales como mutaciones de PTEN o sobreexpresión de ciertas proteínas reguladoras clave (Graff, Expert Opin. Ther. Targets, 2002, 6:103-113, Brognard et al., Cancer Res., 2001, 61:3986-3997). De hecho, PTEN es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en el cáncer humano. Se ha encontrado que PDK1 se sobreexpresa en leucemia mieloide aguda (Zabkiewicz et al., Haematologica, 2014, 99(5):858-864). El potencial de los inhibidores de PDK1 como compuestos anticancerosos se indicó mediante la transfección de una línea celular cancerosa humana PTEN negativa (U87MG) con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra PDK1. La disminución resultante en los niveles de proteína PDK1 condujo a una reducción en la proliferación y supervivencia celulares (Flynn et al., Curr. Biol., 2000, 10:1439-1442).

RSK2 (p90RSK2) es una de las cuatro cinasas S6 ribosómicas (S6K) conocidas en seres humanos, una familia de serina/treonina cinasas que son activadas por la ruta MAPK/ERK. RSK comprende dos dominios de cinasa: el dominio C-terminal autofosforila RSK2, que es necesario para su activación; el dominio N-terminal de RSK2 activada fosforila sustratos aguas abajo, tales como ciertos reguladores transcripcionales. Es posible que RSK2 desempeñe un papel clave en tumores que no dependen de AKT, o proporcione un mecanismo de resistencia clave para evitar la señalización de AKT tras el tratamiento con inhibidores de AKT.

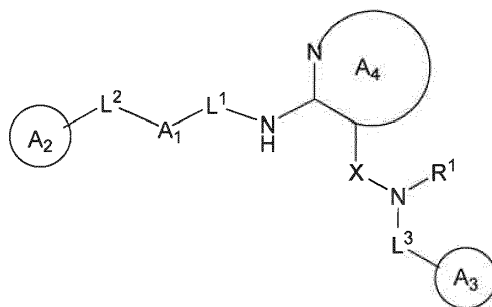
Se sabe que RSK2 se activa mediante fosforilación por PDK1 a través del mecanismo de bolsillo de PIF independiente de PI, y promueve la proliferación celular en diversos tipos de células, y puede contribuir a ciertos cánceres. Por ejemplo, se ha demostrado que RSK2 se activa en ciertas formas de leucemia mieloide. La inhibición de RSK2 indujo muerte celular apoptótica en células de leucemia Molm14 y Mv(4;11) y muestras primarias de pacientes con AML, pero no afectó la apoptosis en células Ba/F3 o K562 o en muestras primarias de pacientes con CML (Elf et al., Blood, 2011, 117(25):6885-6894). Por separado, se ha dado a conocer que la inhibición de RSK2 indujo apoptosis en ciertas células de mieloma, y que la tirosina cinasa receptora, receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3), activa RSK2, que puede inducir la transformación hematopoyética (Kang et al., J. Biol. Chem., 2008, 283(8):4652-4657; Kang et al., Mol. Cell. Biol., 2009, 29(8):2105-2117).

En consecuencia, existe la necesidad de inhibidores eficaces de PDK1 con características farmacológicas y terapéuticas diferenciales. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora que ciertos compuestos deterioran o bloquean la unión al sustrato mediada por el bolsillo de PIF, independiente de PI, y tienen una amplia actividad antitumoral en cánceres hematológicos y otros cánceres. Por un lado, ahora se ha encontrado que estos compuestos parecen modificar la conformación de PDK1 para bloquear la unión de PIF, evitando así la unión y fosforilación de sustratos independientes de PI (dependientes de PIF), mientras que aún inhiben la actividad de la PDK1 cinasa al bloquear también la unión de ATP. Esta función de mecanismo dual puede ser crítica para inhibir eficazmente la señalización de PDK1 al afectar la fosforilación del sustrato tanto dependiente de PI como independiente de PI. Esta función, por lo tanto, podría hacer que estos compuestos sean útiles en el tratamiento de cánceres que son independientes de Akt, o en los que surge resistencia a inhibidores de Akt. Además, tales inhibidores de mecanismo dual pueden tener utilidad en el tratamiento de cánceres que dependen del crecimiento de la actividad de RSK2 u otros sustratos dependientes de PIF aguas abajo de PDK1, esté o no activa AKT.

Se describen aquí métodos que emplean compuestos de fórmula I:

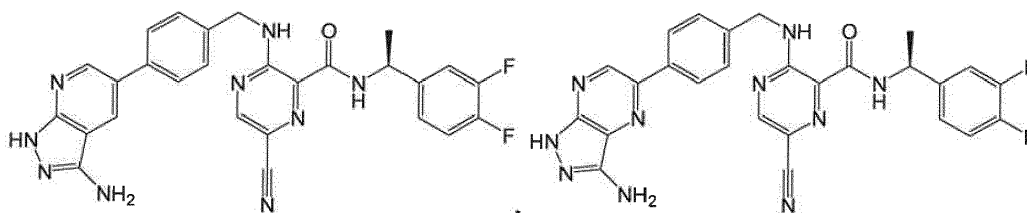


I

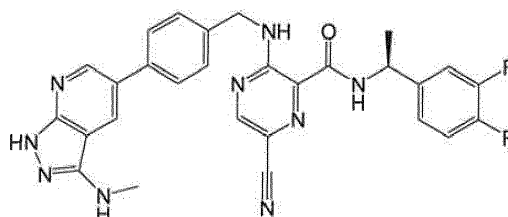
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en la que cada uno de A₁, Anillo A₂, Anillo A₃, Anillo A₄, L¹, L², L³, X y R¹ son como se definen y describen en clases y subclases aquí. Dichos compuestos son útiles como moduladores de las rutas de supervivencia celular que implican a ciertas proteína cinasas (por ejemplo, PDK1, RSK2, Akt), y de este modo son útiles, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades mediadas por PDK1, RSK2 y Akt.

También se describen aquí composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula I como se describe, en las que el compuesto está presente en una cantidad eficaz para inhibir una ruta de supervivencia del cáncer dependiente de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, tal como una ruta dependiente de RSK2, o una ruta independiente de Akt, que está implicada en el crecimiento y supervivencia del cáncer. También se describen aquí composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de Fórmula I y que opcionalmente comprenden además un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional puede ser un agente para el tratamiento del cáncer.

La presente invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

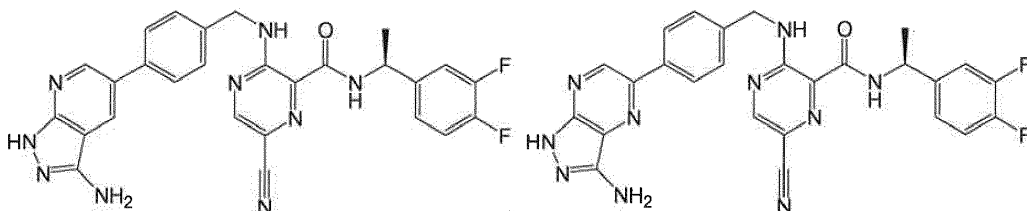


y

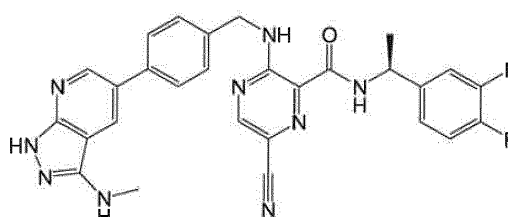


- 5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que el crecimiento o la supervivencia del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste en leucemias, linfomas y mielomas. En algunas realizaciones, el
- 10 cáncer hematológico se selecciona de linfoma anaplásico de células grandes, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de células del manto, linfoma histiocítico, leucemia de células T, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda (linfoblástica), leucemia mielógena aguda, leucemia mieloblástica aguda, y leucemia de células plasmáticas.

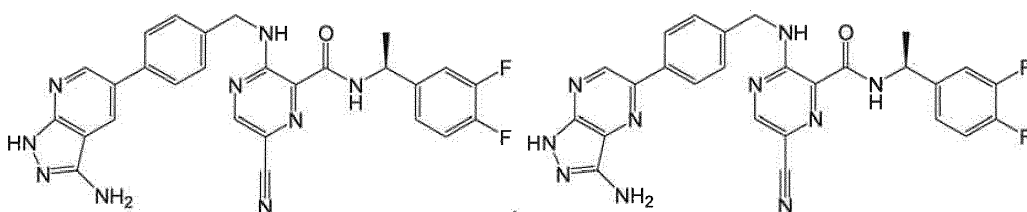
- La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en la que el crecimiento o la proliferación del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada
- 15 por PDK1-PIF, que comprende una formulación que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



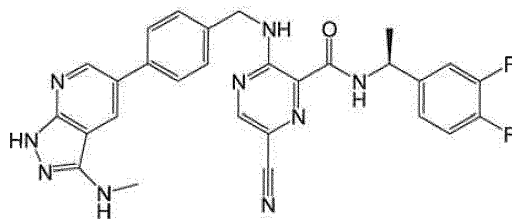
y



- y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos; y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 20 La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para uso en una terapia combinada de tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende una formulación que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



y



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la terapia de combinación comprende además una cantidad eficaz de un segundo agente anticanceroso.

- 5 También se describen aquí métodos para inhibir una ruta de activación de cinasas implicada en el crecimiento y supervivencia del cáncer en un paciente o una muestra biológica, que comprenden administrar a dicho paciente, o poner en contacto dicha muestra biológica con, una cantidad inhibidora eficaz de un compuesto de Fórmula I. También se describen aquí métodos para tratar cualquier trastorno que implique dicha ruta de activación de cinasas, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de
- 10 Fórmula I. Dichos métodos se describen aquí en detalle.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 La Figura 1A muestra las interacciones entre elementos de rutas celulares dependientes de fosfatidilinositol (PI) (mediadas por PH) o independientes de PI (mediadas por PIF); la Figura 1B muestra las interacciones del dominio de PH entre PDK1 y Akt; la Figura 1C muestra la interacción mediada por PIF entre PDK1 y Akt; la Figura 1D muestra la interacción mediada por PIF entre PDK1 y RSK2.

Las Figuras 2A y 2B muestran las curvas de inhibición de la actividad de cinasa de PDK1 para compuestos representativos de Fórmula I: Compuesto 1 (Figura 2A) y Compuesto 2 (Figura 2B).

La Figura 3 muestra la inhibición de la proliferación de líneas celulares de tumores hematológicos in vitro por compuestos de ensayo.

- 20 Las Figuras 4A-4D muestran la inhibición del crecimiento en varias líneas celulares de tumores hematológicos por compuestos de ensayo: MV4-11 (Figura 4A), C1498 (Figura 4B) y A20 (Figura 4C). La Figura 4D proporciona una clave para las Figuras 4A-4C, y proporciona datos de IC₅₀ para los compuestos en cada línea celular.

- 25 La Figura 5A muestra gráficas de puntos de FACS de células MV4-11 tratadas con vehículo o con un compuesto de ensayo. Los parámetros son anexina V (AV; eje horizontal) frente a yoduro de propidio (PI; eje vertical); la Figura 5B muestra el porcentaje de células totales en los cuadrantes de agrupamientos para PI+AV+ y PI-AV+ de las gráficas de la Figura 5A; la Figura 5C muestra las relaciones dosis-respuesta de la capacidad de los compuestos de ensayo para inducir apoptosis según se mide por las células en los cuadrantes PI-AV+ de las gráficas de la Figura 5A.

- 30 La Figura 6A muestra una transferencia Western de niveles de RSK2 fosforilada (pRSK2) y PDK1 fosforilada (pPDK1) a diversas concentraciones de compuestos de ensayo; la Figura 6B muestra las cantidades (cuantificación de 6A normalizada a GAPDH) de pRSK2 y pPDK1 detectadas a las 24 horas de exposición a diversas concentraciones de compuestos de ensayo, expresadas como porcentaje de las proteínas fosforiladas respectivas detectadas en muestras de control; la Figura 6C muestra las cantidades de pRSK2 y pPDK1 detectadas basándose en la exposición a compuestos de ensayo 30 nM durante diversos tiempos, expresadas como un porcentaje de las proteínas fosforiladas respectivas detectadas en las muestras de control.
- 35

- La Figura 7A muestra una transferencia de Western de niveles de RSK2 fosforilada (pRSK2) y PDK1 fosforilada (pPDK1) a diversas concentraciones de tres compuestos de ensayo; las Figuras 7B y 7C muestran las cantidades (cuantificación de 7A normalizada a GAPDH) de pPDK1 y pRSK2 detectadas después de la exposición a diversas concentraciones de compuestos de ensayo, expresadas como un porcentaje de las proteínas fosforiladas respectivas detectadas en muestras de control.
- 40

- La Figura 8A muestra una transferencia Western de niveles de RSK2 fosforilada (pRSK2), PDK1 fosforilada (pPDK1), Akt fosforilada (pAkt) e IKK fosforilada (pIKK) a diversas concentraciones de tres compuestos de ensayo; las Figuras 8B a 8E muestran las cantidades (cuantificación de 8A normalizada a GAPDH) de pPDK1, pRSK2, pAkt y pIKK detectadas después de la exposición a diversas concentraciones de compuestos de ensayo, expresadas como un porcentaje de las proteínas fosforiladas respectivas detectadas en muestras de control.
- 45

Las Figuras 9A-9C representan la sensibilidad de la línea celular KG-1 al Compuesto 1, y la inhibición de los niveles de pRSK2 y pPDK1 a una concentración de compuesto de 100 nM.

Las Figuras 10A-10D muestran datos ejemplares obtenidos de la cuantificación de análisis de transferencia Western de muestras tumorales de xenoinjertos de tumor MV4-11 después de una única dosis de compuesto. Las Figuras 10A y 10B muestran los niveles de pPDK1 después de una exposición de 4 y 8 horas a los compuestos de ensayo, expresados como un porcentaje de los niveles detectados en las muestras de control. Las Figuras 10C y 10D muestran los niveles de pRSK2 y los niveles de pAkt después de una exposición de 8 horas a los compuestos de ensayo, expresados como un porcentaje de los niveles detectados en las muestras de control. Los números encima de las columnas indican la concentración de compuesto (mM) presente en tumores, según se determina por LC-MS/MS.

La Figura 11A muestra la mediana del volumen del tumor MV4-11 en función del tiempo para diversos grupos de tratamiento expuestos a compuestos de Fórmula I en un modelo de xenoinjerto murino; la Figura 11B muestra la distribución del volumen del tumor entre los grupos de tratamiento; la Figura 11C muestra el peso corporal medio del grupo porcentual en función del tiempo para varios grupos de tratamiento.

La Figura 12A muestra una representación tridimensional de un cocrystal en el que el Compuesto 3 está unido a PDK1; la Figura 12B muestra una representación tridimensional comparativa de cocristales en los que el Compuesto 3 (gris más claro) o ATP (gris más oscuro) está unido a PDK1; la Figura 12C muestra una representación tridimensional comparativa de un cocrystal en el que el Compuesto 3 (gris más oscuro) o GSK2334470 (gris más claro) está unido a PDK1; la Figura 12D muestra una representación tridimensional comparativa de un cocrystal en el que el Compuesto 3 (gris más claro) o BX-320 (gris más oscuro) está unido a PDK1; la Figura 12E muestra una representación tridimensional comparativa de cocristales en los que el Compuesto 3 (gris medio), GSK2334470 (gris más claro) o BX-320 (gris más oscuro) está unido a PDK1.

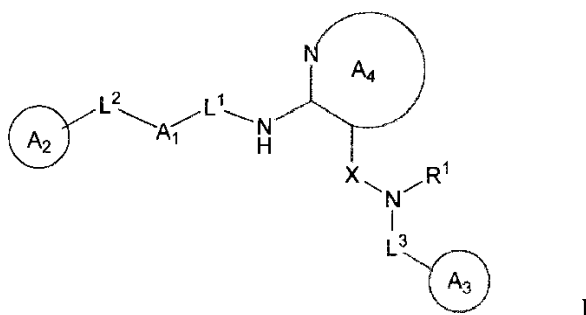
La Figura 13A muestra una representación tridimensional de cocristales en los que el Compuesto 3 (gris medio), GSK2334470 (gris más claro) o BX-320 (gris más oscuro) está unido a PDK1; la Figura 13B ilustra el esquema conceptual de un ensayo de unión de PIF-tida en el que puede evaluarse la actividad comparativa del bloqueo de PIF-tida de los compuestos de ensayo; la Figura 13C muestra la unión de PIF-tida medida por PDK1 en presencia y ausencia de compuestos de ensayo, expresada como un porcentaje de control de DMSO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE CIERTAS REALIZACIONES

Compuestos útiles en los métodos de la invención

PDK1 puede interactuar con sus sustratos a través de mecanismos dependientes de fosfatidil-inositol (PI) (mediados por PH) o independientes de PI (mediados por PIF). Aquí describimos una familia de compuestos que ocupan tanto el bolsillo de unión a ATP como el bolsillo adaptativo ("alostérico") y bloquean la unión del sustrato independiente de PI y tienen actividad antitumoral en tumores sólidos y cánceres hematológicos. Los compuestos de Fórmula I, como se describen a continuación, tienen un perfil de actividad distinto, que se manifiesta en la capacidad de perjudicar el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas, tales como las células que son resistentes a la inhibición de Akt o que dependen de la actividad de RSK2.

De este modo, se describen aquí métodos de uso de un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

R¹ es hidrógeno o alifático de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o:

R¹ y un sustituyente en el Anillo A₄ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado de 5-7 miembros, parcialmente insaturado o aromático, opcionalmente sustituido, que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

X es -C(O)- o -S(O)₂-,

L¹ es un enlace covalente o un grupo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de alquileo de C₁₋₄, alquenileno de C₂₋₄, o alquinileno de C₂₋₄, en la que una o más unidades metilénicas de L¹ están opcional e

independientemente sustituidas con $-\text{Cy}^1$ -, $-\text{O}-$ -, $-\text{S}-$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{O}$ -, $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{OC}(\text{O})$ -, o $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -;

Cy^1 es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, heterocicileno de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o heteroarileno de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R^2 es hidrógeno o alifático de C_{1-6} opcionalmente sustituido;

A_1 es un enlace covalente o un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de carbocicileno monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, carbocicileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, heterocicileno monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, heterocicileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, fenileno, arileno bicíclico de 8-10 miembros, heteroarileno monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o heteroarileno bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

L^2 es un enlace covalente, alquilidenileno, o una cadena alquilénica opcionalmente sustituida en la que una o más unidades metilénicas de L^2 están opcional e independientemente sustituidas con $-\text{O}-$ -, $-\text{S}-$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{O}$ -, $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{OC}(\text{O})$ -, o $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -;

el anillo A_2 es un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo tricíclico de 10-16 miembros saturado, parcialmente insaturado o aromático, que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, en la que el Anillo A_2 está opcionalmente sustituido con 1-4 grupos R^x ;

cada R^x es, independientemente, $-\text{R}$, alquilidenilo opcionalmente sustituido, oxo, halo, $-\text{NO}_2$ -, $-\text{CN}$ -, $-\text{OR}$ -, $-\text{SR}$ -, $-\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{CO}_2\text{R}$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{S}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{R}$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{OR}$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{=NR}')\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{C}(\text{=NR}')\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{C}=\text{NOR}$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}')_2$ -, $-\text{N}(\text{R}')\text{S}(\text{O})_2\text{R}$ -, o $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$;

cada R es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático de C_{1-6} , un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R' es independientemente $-\text{R}$, o dos grupos R' , en el mismo nitrógeno, se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido, saturado, parcialmente insaturado o aromático, que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

L^3 es un enlace covalente o una cadena alquilénica de C_{1-4} opcionalmente sustituida, en la que una o más unidades metilénicas de L^3 están opcional e independientemente sustituidas con $-\text{O}-$ -, $-\text{S}-$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{C}(\text{O})\text{O}$ -, $-\text{OC}(\text{O})\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{S}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}^2)$ -, $-\text{N}(\text{R}^2)\text{S}(\text{O})_2$ -, $-\text{OC}(\text{O})$ -, o $-\text{C}(\text{O})\text{O}$ -;

el anillo A_3 es un anillo opcionalmente sustituido, seleccionado de un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados

independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

el anillo A₄ es un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre; en la que cualquier carbono sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R³, R⁴, o R⁵, y cualquier nitrógeno sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R⁶;

cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es independientemente -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R³ y R⁴ o R⁴ y R⁵ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R⁶ es independientemente -R, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, o -S(O)₂N(R')₂; o:

R³ y R⁶ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo heterocíclico de 5-6 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

con la condición de que:

cuando A₁ sea un anillo monocíclico bivalente y L¹ sea un enlace covalente, L² no sea -O-;

cuando A₁ sea un anillo monocíclico o bicíclico bivalente, L¹ y L² no sean simultáneamente un enlace covalente; y

L¹, A₁, y L² no sean simultáneamente un enlace covalente.

Por ejemplo, los compuestos de Fórmula I como se describen aquí pueden usarse para inhibir el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de las células cancerosas en las que están implicadas rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF.

Se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita induciendo la apoptosis de las células cancerosas mediante la inhibición de rutas de supervivencia del cáncer dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita inhibiendo el crecimiento o la proliferación de células cancerosas dependiente de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas inhibiendo rutas de crecimiento o proliferación de células cancerosas independientes de Akt que dependen de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para inducir apoptosis de células cancerosas inhibiendo rutas de supervivencia de células cancerosas independientes de Akt que dependen de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con un compuesto de Fórmula I como se describe aquí en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento o proliferación de las células cancerosas.

También se describe aquí un método para inducir la apoptosis de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para inhibir la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1 en células cancerosas, que comprende poner en contacto las células con un compuesto de Fórmula I, mediante lo cual se inhibe el crecimiento o proliferación de las células cancerosas.

- 5 También se describe aquí un método para inducir apoptosis en células cancerosas, que comprende poner en contacto células cancerosas con un compuesto de Fórmula I como se describe aquí que inhibe la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1.

- 10 También se describe aquí un método para preparar un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer cuyo crecimiento o supervivencia depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

También se describe aquí un producto que comprende un recipiente y un medicamento para uso en el tratamiento de cáncer cuyo crecimiento o supervivencia depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, en el que el medicamento comprende un compuesto de Fórmula I como se describe aquí y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 15 Los compuestos de Fórmula I como se describen aquí pueden usarse para inhibir el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de células cancerosas en las que están implicadas rutas de supervivencia celular dependientes de RSK2.

- 20 También se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita induciendo apoptosis de las células cancerosas mediante la inhibición de las rutas de supervivencia dependientes de RSK2, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita inhibiendo el crecimiento o proliferación de células cancerosas dependiente de RSK2, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 25 También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la actividad de cinasa de RSK2, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con un compuesto de Fórmula I como se describe aquí en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de RSK2 en las células cancerosas.

También se describe aquí un método para inducir apoptosis en células cancerosas, que comprende poner en contacto células cancerosas con un compuesto de Fórmula I como se describe aquí que inhibe la activación de RSK2 por PDK1.

- 30 Los compuestos de Fórmula I como se describen aquí pueden usarse para inhibir el crecimiento, la proliferación o la supervivencia de células cancerosas en las que están implicadas rutas de supervivencia celular independientes de Akt. Se considera que tales células son resistentes a la inhibición de la actividad de Akt o a la inhibición de la actividad de las rutas de supervivencia mediadas por Akt. De este modo, las células que pueden sobrevivir incluso si Akt es sustancialmente inactiva, o que son resistentes a, o no responden a, inhibidores de Akt, pueden aún ser inhibidas por compuestos de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita induciendo apoptosis de las células cancerosas mediante la inhibición de rutas de supervivencia de células cancerosas independientes de Akt, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 40 También se describe aquí un método para tratar cáncer en un sujeto que lo necesita inhibiendo el crecimiento o proliferación de células cancerosas independiente de Akt, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 45 También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación no depende de la actividad de cinasa de Akt, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con un compuesto de Fórmula I como se describe aquí en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento o proliferación de las células cancerosas.

También se describe aquí un método para inducir apoptosis de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación no depende de la actividad de cinasa de Akt, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 50 También se describe aquí un método para inducir apoptosis en células cancerosas en el que la viabilidad es independiente de Akt, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí que es eficaz para interferir con la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1 en las células cancerosas.

También se describe aquí un método para inhibir el crecimiento o proliferación de células cancerosas independiente de Akt, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 5 También se describe aquí un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer cuyo crecimiento o proliferación es independiente de Akt, que comprende administrar al sujeto una cantidad de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí que es eficaz para alterar el crecimiento o proliferación del cáncer.

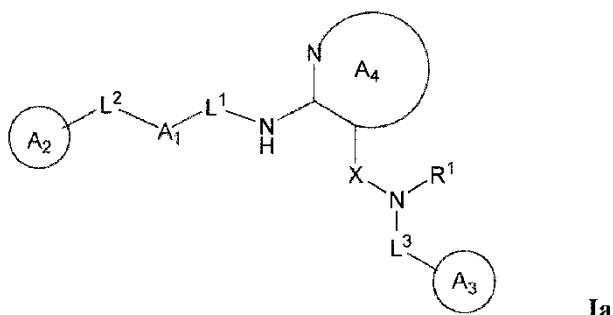
- 10 También se describe aquí un método para inducir apoptosis en células cancerosas en el que la viabilidad es dependiente de RSK2 o independiente de Akt, que comprende poner en contacto las células cancerosas con una cantidad de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí que es eficaz para interferir con la unión al sustrato mediada por PIF por PDK1 en las células cancerosas.

También se describe aquí un método para inducir apoptosis de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la actividad de unión a PIF de PDK1, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 15 También se describe aquí un método para inducir apoptosis de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la actividad de unión a PIF de PDK1, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

También se describe aquí un método para inducir apoptosis de células cancerosas cuyo crecimiento o proliferación depende de la actividad de RSK2, comprendiendo el método poner en contacto las células cancerosas con una cantidad eficaz de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí.

- 20 También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula Ia:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

R¹ es hidrógeno o alifático de C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o:

- 25 R¹ y un sustituyente en el Anillo A₄ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado de 5-7 miembros, parcialmente insaturado o aromático, opcionalmente sustituido, que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

X es -C(O)- o -S(O)₂-,

- 30 L¹ es un enlace covalente o un grupo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de alquileo de C₁₋₄, alquilenilo de C₂₋₄, o alquinileno de C₂₋₄, en el que una o más unidades metilénicas de L¹ están opcional e independientemente sustituidas con -Cy¹-, -O-, -S-, -N(R²)-, -C(O)-, -C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)-, -N(R²)C(O)O-, -OC(O)N(R²)-, -S(O)₂-, -S(O)₂N(R²)-, -N(R²)S(O)₂-, -OC(O)-, o -C(O)O-;

- 35 Cy¹ es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, heterocicileno de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o heteroarileno de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R² es hidrógeno o alifático de C₁₋₆ opcionalmente sustituido;

- 40 A₁ es un enlace covalente o un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de carbocicileno monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, carbocicileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, heterocicileno monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, heterocicileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, fenileno, arileno bicíclico de 8-10 miembros, heteroarileno monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno,

oxígeno, o azufre, o heteroarileno bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

L² es un enlace covalente, alquilidenileno, o una cadena alquilénica opcionalmente sustituida en la que una o más unidades metilénicas de L² están opcional e independientemente sustituidas con -O-, -S-, -N(R²)-, -C(O)-, -C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)-, -N(R²)C(O)O-, -OC(O)N(R²)-, -S(O)₂-, -S(O)₂N(R²)-, -N(R²)S(O)₂-, -OC(O)-, o -C(O)O-;

el anillo A₂ es un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo tricíclico de 10-16 miembros saturado, parcialmente insaturado o aromático que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, en la que el Anillo A₂ está opcionalmente sustituido con 1-4 grupos R^x;

cada R^x es independientemente -R, alquilidenilo opcionalmente sustituido, oxo, halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂;

cada R es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático de C₁₋₆, un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R' es independientemente -R, o dos grupos R' en el mismo nitrógeno se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido, saturado, parcialmente insaturado o aromático que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

L³ es un enlace covalente o una cadena alquilénica de C₁₋₄ opcionalmente sustituida en la que una o más unidades metilénicas de L³ están opcional e independientemente sustituidas con -O-, -S-, -N(R²)-, -C(O)-, -C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)N(R²)-, -N(R²)C(O)-, -N(R²)C(O)O-, -OC(O)N(R²)-, -S(O)₂-, -S(O)₂N(R²)-, -N(R²)S(O)₂-, -OC(O)-, o -C(O)O-;

el anillo A₃ es un anillo opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

el anillo A₄ es un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre; en la que cualquier carbono sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R³, R⁴, o R⁵, y cualquier nitrógeno sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R⁶;

cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es independientemente -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R³ y R⁴ o R⁴ y R⁵ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados

independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R^6 es independientemente -R, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, o -S(O)₂N(R')₂; o:

- 5 R^3 y R^6 se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo heterocíclico de 5-6 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

10 También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula Ia, anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que:

R^1 es hidrógeno o alifático de C₁₋₆ opcionalmente sustituido;

X es -C(O)- o -S(O)₂-;

L^1 es un enlace covalente o un alquileo de C₁₋₄ opcionalmente sustituido;

- 15 A_1 es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de carbociclileno monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, carbociclileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, heterociclileno monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, heterociclileno bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, fenileno, arileno bicíclico de 8-10 miembros, heteroarileno monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o heteroarileno bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

L^2 es un enlace covalente, o una cadena alquilénica opcionalmente sustituida;

- 25 el anillo A_2 es un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo tricíclico de 10-16 miembros saturado, parcialmente insaturado o aromático que tiene 0-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, en la que el Anillo A_2 está opcionalmente sustituido con 1-4 grupos R^x ;

- 35 cada R^x es independientemente -R, alquilidenilo opcionalmente sustituido, oxo, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂;

- 40 cada R es independientemente hidrógeno o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático de C₁₋₆, un anillo carbocíclico monocíclico de 3-7 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

- 45 cada R' es independientemente -R, o dos grupos R' en el mismo nitrógeno se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo de 5-8 miembros opcionalmente sustituido, saturado, parcialmente insaturado o aromático que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

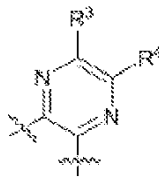
- 50 L^3 es un enlace covalente o una cadena alquilénica de C₁₋₄ opcionalmente sustituida;

o L^3 es metileno no sustituido o metileno sustituido con metilo o etilo;

el anillo A_3 es un anillo opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado, un anillo heterocíclico monocíclico de 4-7 miembros saturado o parcialmente

insaturado que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, o azufre, un anillo heterocíclico bicíclico de 7-10 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, un anillo fenílico, un anillo arílico bicíclico de 8-10 miembros, un anillo heteroarílico monocíclico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico bicíclico de 8-10 miembros que tiene 1-4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

el anillo A₄ es



y

R³ es -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂;

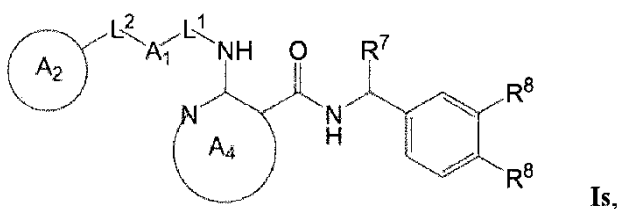
R⁴ es -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -NHS(O) alquilo C₁₋₆, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R³ y R⁴ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

Tales compuestos y métodos para su preparación se describen en detalle en la publicación de patente internacional WO 2011-044157 A1.

También se describen aquí métodos para uso de compuestos de Fórmula I, en la que el anillo A₃ es fenilo, sustituido con uno o dos átomos de flúor en la posición meta o en la posición orto.

También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula Is:



Is,

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que cada uno de A₁, A₂, L¹ y L² es como se define para la Fórmula I, y

cualquier carbono sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R³, R⁴, o R⁵, y cualquier nitrógeno sustituible en el Anillo A₄ está opcionalmente sustituido con R⁶;

cada uno de R³, R⁴, y R⁵ es independientemente -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R³ y R⁴ o R⁴ y R⁵ se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

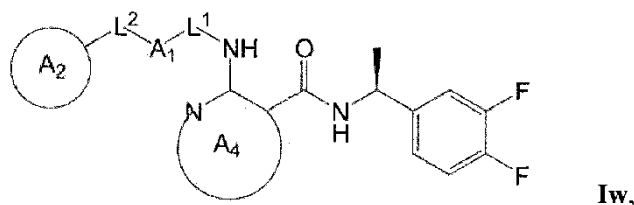
cada R^6 es independientemente -R, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, o -S(O)₂N(R')₂; o:

R^3 y R^6 se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo heterocíclico de 5-6 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

R^7 es hidrógeno o metilo; y

cada R^8 es independientemente hidrógeno o halo.

También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula **Iw**:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que cada uno de A_1 , A_2 , L^1 y L^2 es como se define para la Fórmula I, y cualquier carbono sustituible en el Anillo A_4 está opcionalmente sustituido con R^3 , R^4 , o R^5 , y cualquier nitrógeno sustituible en el Anillo A_4 está opcionalmente sustituido con R^6 ;

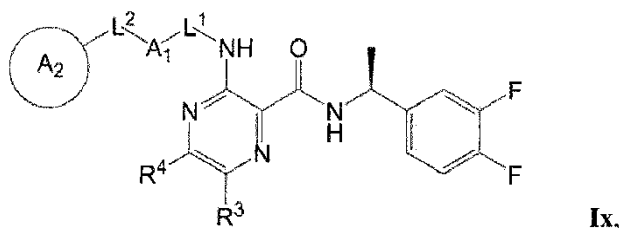
cada uno de R^3 , R^4 , y R^5 es independientemente -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R^3 y R^4 o R^4 y R^5 se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre;

cada R^6 es independientemente -R, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, o -S(O)₂N(R')₂; o:

R^3 y R^6 se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo heterocíclico de 5-6 miembros saturado o parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula **Ix**:



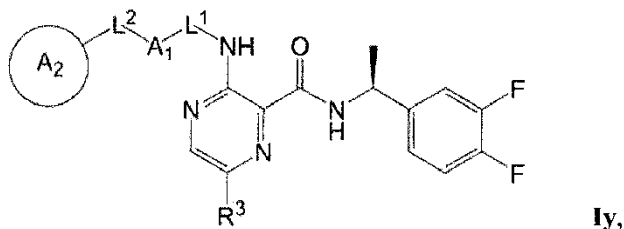
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que cada uno de A_1 , A_2 , L^1 y L^2 es como se define para la Fórmula I, y cada uno de R^3 y R^4 es independientemente -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂; o:

R^3 y R^4 se toman junto con sus átomos intermedios para formar un anillo condensado opcionalmente sustituido seleccionado de un anillo carbocíclico de 4-7 miembros parcialmente insaturado, fenilo, un anillo heterocíclico de 5-6 miembros parcialmente insaturado que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de

nitrógeno, oxígeno, o azufre, o un anillo heteroarílico de 5-6 miembros que tiene 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno, o azufre.

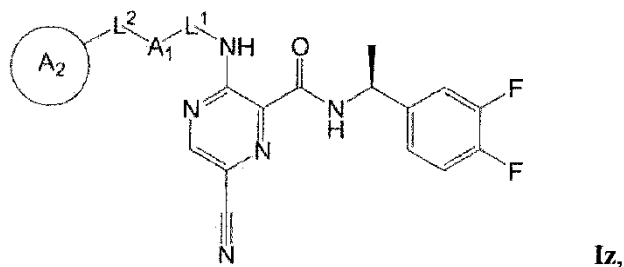
También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula **Iy**:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que cada uno de A₁, A₂, L¹ y L² es como se define para la Fórmula I, y R³ es -R, -halo, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R')₂, -C(O)R, -CO₂R, -C(O)C(O)R, -C(O)CH₂C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, -C(O)N(R')₂, -S(O)₂N(R')₂, -OC(O)R, -N(R')C(O)R, -N(R')N(R')₂, -N(R')OR, -N(R')C(=NR')N(R')₂, -C(=NR')N(R')₂, -C=NOR, -N(R')C(O)N(R')₂, -N(R')S(O)₂N(R')₂, -N(R')S(O)₂R, o -OC(O)N(R')₂.

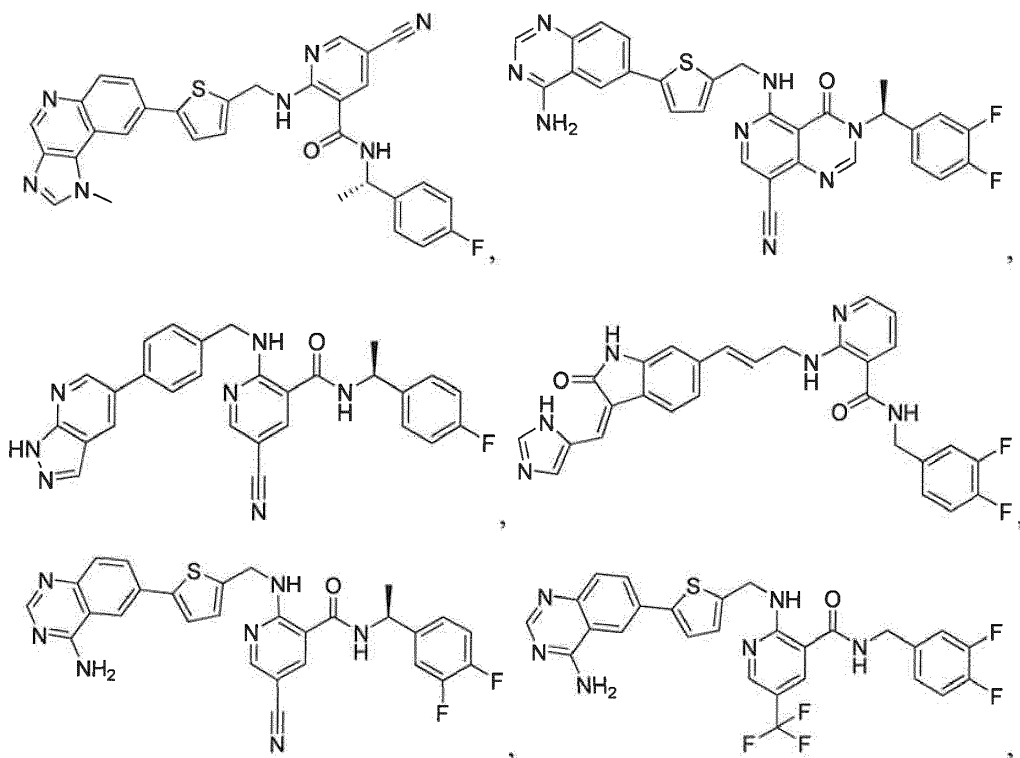
10 También se describen aquí métodos que usan un compuesto de Fórmula **Iz**:

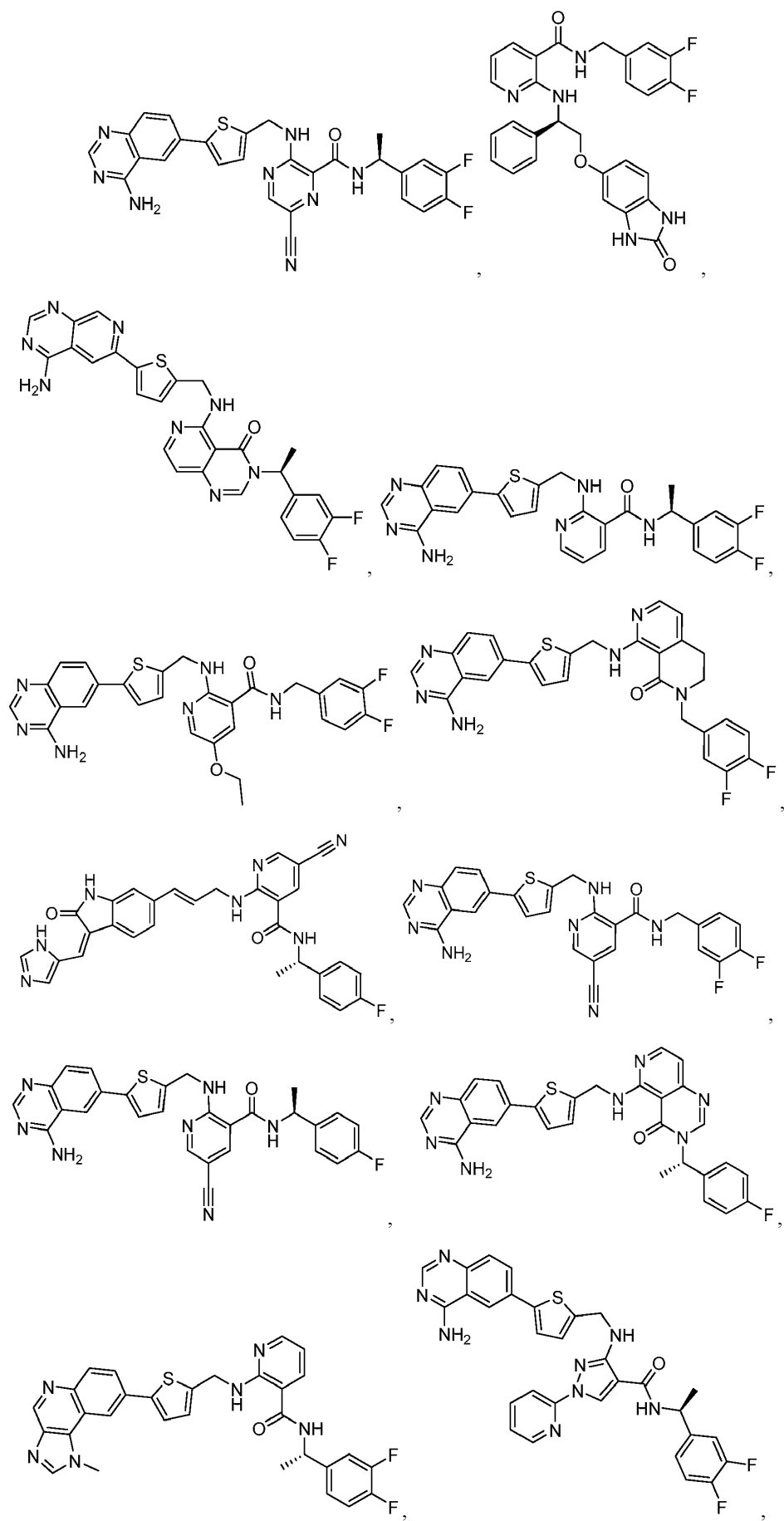


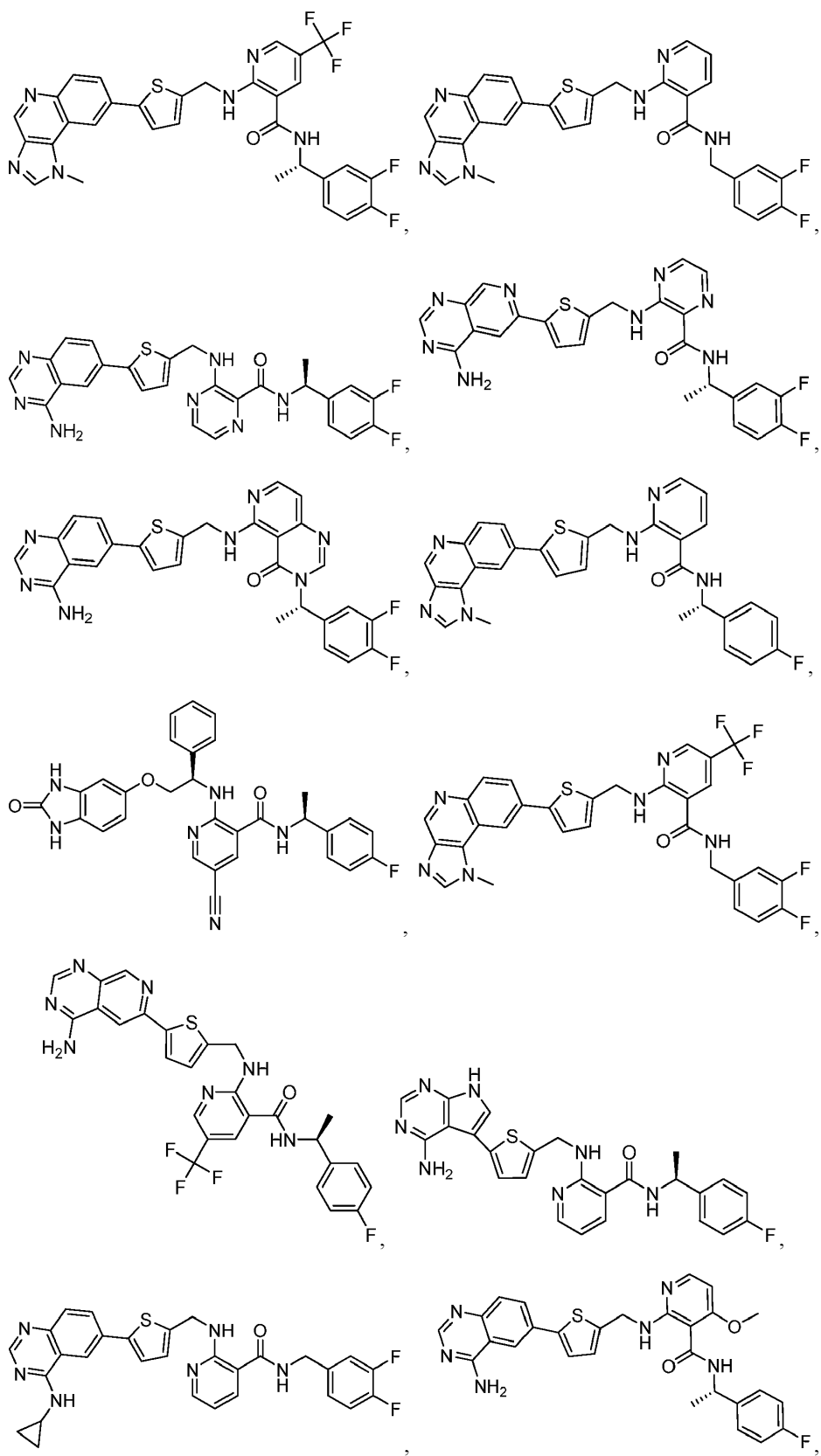
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

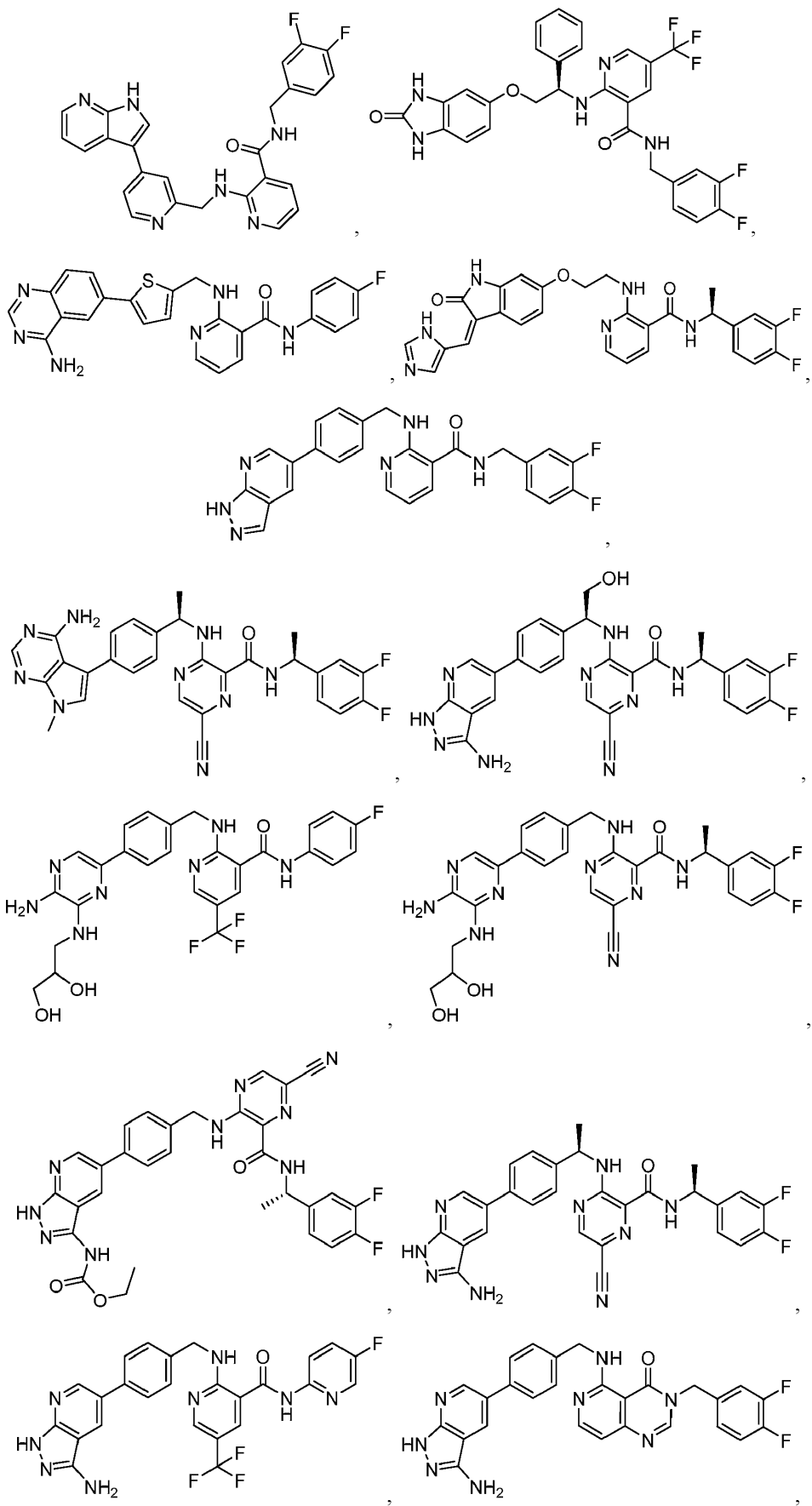
en la que A₁, A₂, L¹ y L² son como se define para la Fórmula I.

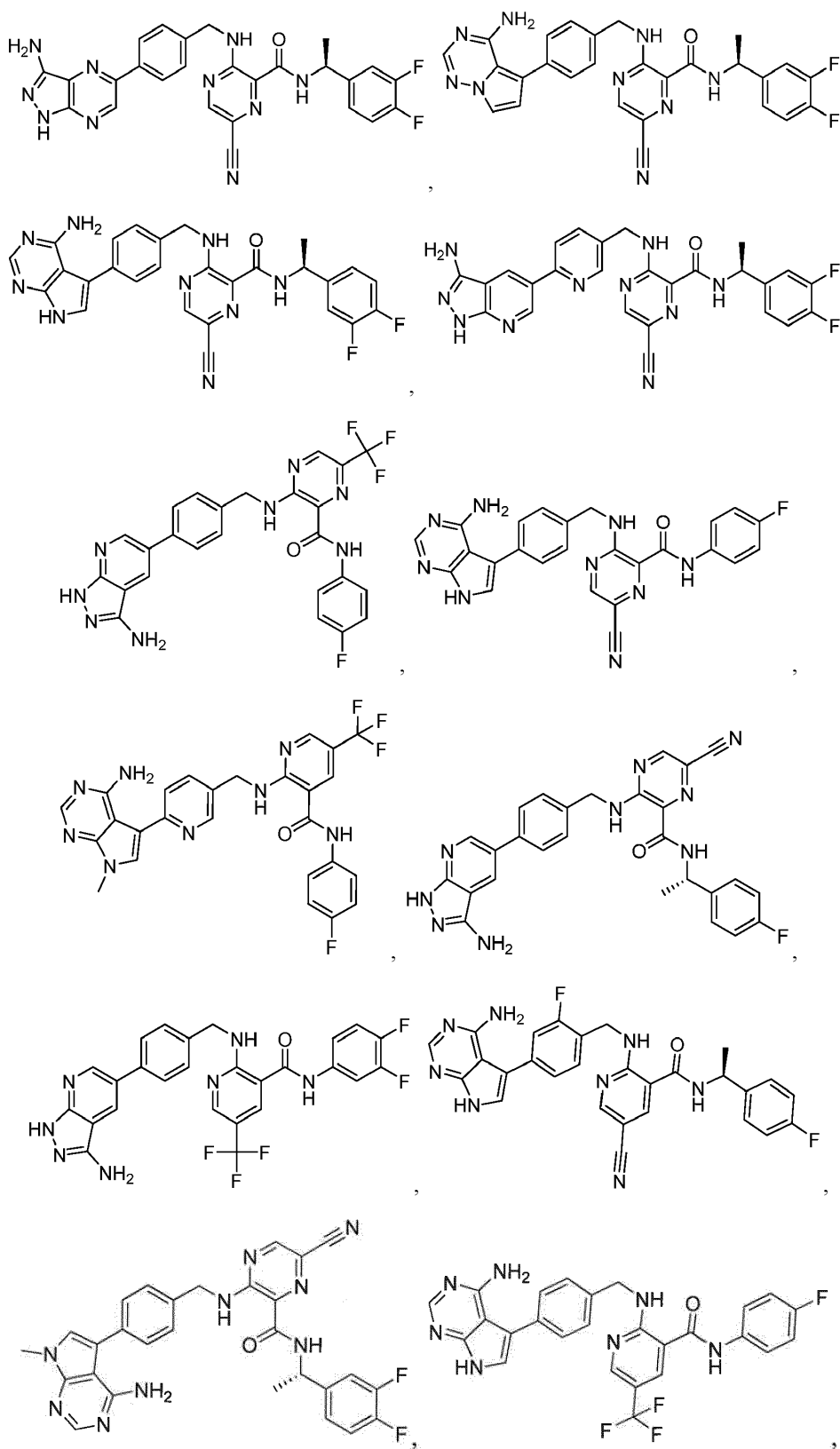
Los métodos pueden usar cualquiera de los siguientes compuestos:

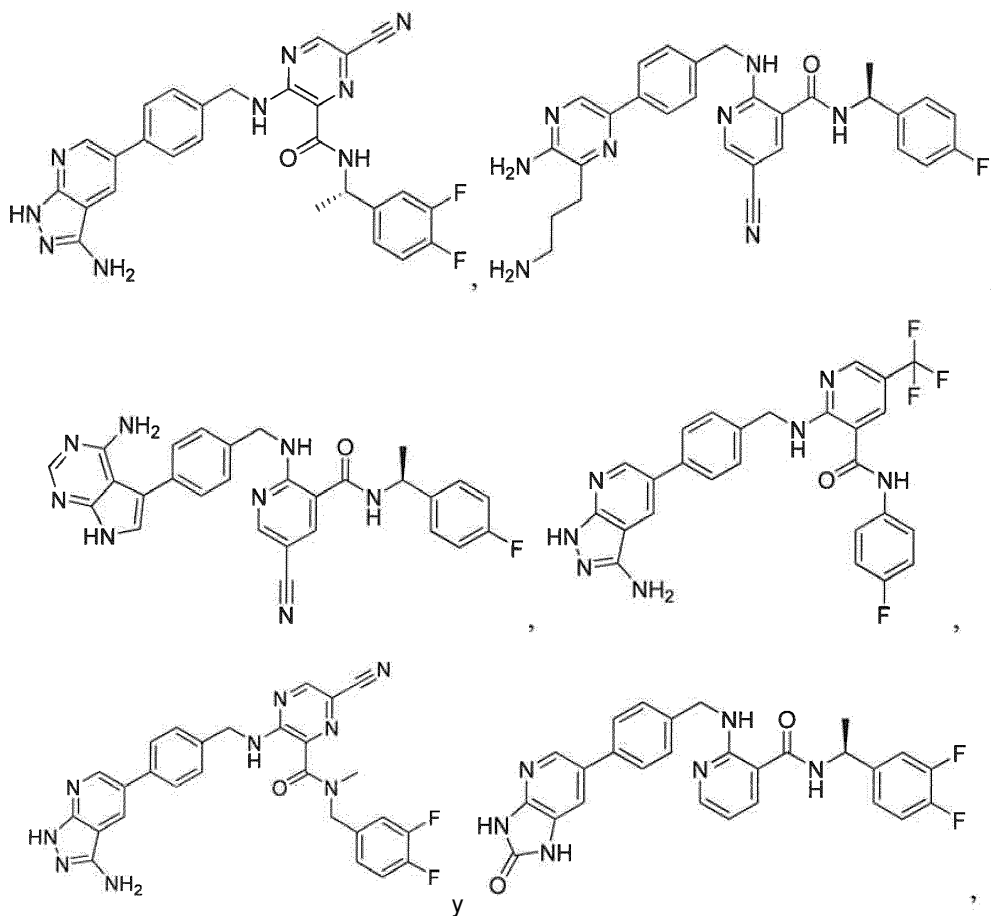






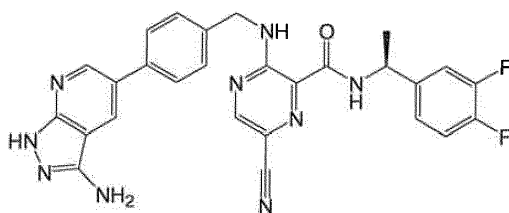




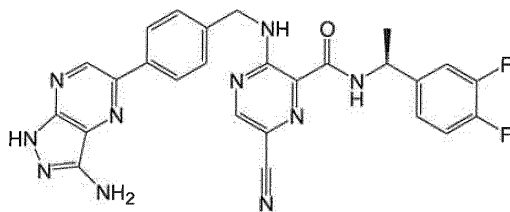


o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

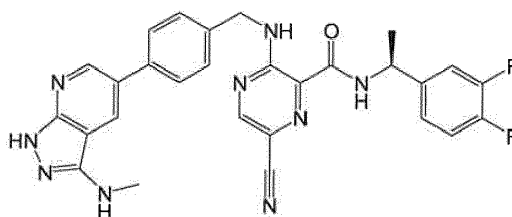
- 5 La presente invención proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



[1-(3,4-difluoro-fenil)-etil]-amida del ácido 3-[4-(3-amino-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il)-bencilamino]-6-ciano-pirazin-2-carboxílico (Compuesto 3),



- 10 [1-(3,4-difluoro-fenil)-etil]-amida del ácido 3-[4-(3-amino-1H-pirazolo[3,4-b]pirazin-5-il)-bencilamino]-6-ciano-pirazin-2-carboxílico (Compuesto 1),



[1-(3,4-difluoro-fenil)-etil]-amida del ácido 6-ciano-3-[4-(3-metilamino-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-5-il)-bencilamino]-pirazin-2-carboxílico (Compuesto 2), o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores, para uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que el crecimiento o supervivencia del

cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describe aquí un uso de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en el que están implicadas rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF.

También se describe aquí un uso de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en el que están implicadas las rutas de supervivencia celular dependientes de RSK2.

También se describe aquí un uso de un compuesto de Fórmula I como se describe aquí para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer en el que están implicadas rutas de supervivencia celular independientes de Akt.

Las definiciones de grupos funcionales y términos químicos específicos se describen con más detalle a continuación. Para los fines de esta invención, los elementos químicos se identifican según la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ª ed., cubierta interior, y los grupos funcionales específicos se definen generalmente como se describe allí. Además, los principios generales de química orgánica, así como los restos funcionales y reactividad específicos, se describen en Organic Chemistry, Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito, 1999; Smith y March March's Advanced Organic Chemistry, 5ª edición, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 2001; Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers, Inc., Nueva York, 1989; Carruthers, Some Modern Methods of Organic Synthesis, 3ª edición, Cambridge University Press, Cambridge, 1987.

A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas aquí también pretenden incluir todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace Z y E, e isómeros conformacionales Z y E. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales, así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Además, a menos que se establezca de otro modo, las estructuras representadas aquí también pretenden incluir compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras que incluyen el reemplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido con ^{13}C o ^{14}C , están dentro del alcance de esta invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, como sondas en ensayos biológicos, o como agentes terapéuticos según la presente invención.

Cuando se prefiere un enantiómero particular, en algunas realizaciones se puede proporcionar sustancialmente libre del enantiómero correspondiente, y también se puede denominar "enriquecido ópticamente". "Enriquecido ópticamente", como se usa aquí, significa que el compuesto se compone de una proporción significativamente mayor de un enantiómero. En ciertas realizaciones, el compuesto está formado por al menos alrededor de 90% en peso de un enantiómero preferido. En otras realizaciones, el compuesto está formado por al menos alrededor de 95%, 98% o 99% en peso de un enantiómero preferido. Los enantiómeros preferidos pueden aislarse de mezclas racémicas mediante cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) quiral, y la formación y cristalización de sales quirales, o pueden prepararse mediante síntesis asimétrica. Véase, por ejemplo, Jacques et al., Enantiomers, Racemates and Resolutions (Wiley Interscience, Nueva York, 1981); Wilen, et al., Tetrahedron 33:2725 (1977); Eliel, E.L., Stereochemistry of Carbon Compounds (McGraw-Hill, NY, 1962); Wilen, S.H. Tables of Resolving Agents and Optical Resolutions p. 268 (E.L. Eliel, Ed., Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, IN 1972).

El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo, o silicio (incluyendo cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo, o silicio; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico; o un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico, por ejemplo N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR^+ (como en pirrolidinilo sustituido en N)).

“Actividad catalítica de PDK1”, como se usa aquí, se refiere a la actividad catalítica de la cinasa PDK1. De este modo, cuando la actividad catalítica de PDK1 disminuye en presencia de un compuesto proporcionado, la fosforilación de un sustrato de PDK1 (por ejemplo, Akt o la propia PDK1 en el caso de autofosforilación) disminuye con respecto a la cantidad de fosforilación en ausencia del compuesto proporcionado. En algunas realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es menor que 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es menor que 500 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es menor que 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es menor que 10 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es menor que 1 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es de 0,1 nM a 10 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es de 0,1 nM a 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es de 0,1 nM a 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad catalítica de PDK1 es de 0,1 nM a 10 nM.

“Actividad de unión a PIF de PDK1”, como se usa aquí, se refiere a la unión al sustrato dependiente de PIF por PDK1. De este modo, cuando la actividad de unión a PIF de PDK1 disminuye en presencia de un compuesto proporcionado, la fosforilación de un sustrato de PDK1 dependiente de la unión a PIF (por ejemplo, RSK2) disminuye con respecto a la cantidad de fosforilación en ausencia del compuesto proporcionado. En algunas realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es menor que 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es menor que 500 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es menor que 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es menor que 10 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es menor que 1 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es de 0,1 nM a 10 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es de 0,1 nM a 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es de 0,1 nM a 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de unión a PIF de PDK1 es de 0,1 nM a 10 nM.

“Actividad de activación de RSK2”, como se usa aquí, se refiere a la fosforilación de RSK2, tal como mediante PDK1. De este modo, cuando la actividad de activación de RSK2 disminuye en presencia de un compuesto proporcionado, la fosforilación de RSK2 disminuye con respecto a la cantidad de fosforilación en ausencia del compuesto proporcionado. En algunas realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es menor que 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es menor que 500 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es menor que 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es menor que 10 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es menor que 1 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es de 0,1 nM a 10 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es de 0,1 nM a 1 μ M. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es de 0,1 nM a 100 nM. En otras realizaciones, la IC₅₀ de un compuesto proporcionado frente a la actividad de activación de RSK2 es de 0,1 nM a 10 nM.

En otro aspecto, los compuestos de Fórmula I como se describen aquí son útiles para el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos y/o afecciones que pueden aliviarse inhibiendo (es decir, disminuyendo) ciertas actividades de PDK1, incluyendo la unión al sustrato del bolsillo de PIF independiente de PI y el crecimiento o proliferación celulares dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF. Como se usa aquí, los términos “tratamiento”, “tratar” y “tratando” se refieren a revertir, aliviar, retrasar el comienzo de, o inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno, o uno o más síntomas del mismo, como se describe aquí. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse después de que se hayan desarrollado uno o más síntomas. En otras realizaciones, el tratamiento puede administrarse en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un individuo susceptible antes de la aparición de los síntomas (por ejemplo, a la luz de un historial de síntomas y/o a la luz de factores genéticos u otros factores de susceptibilidad). El tratamiento también puede continuarse después de que los síntomas se hayan resuelto, por ejemplo para prevenir o retrasar su recidiva.

La presente descripción proporciona métodos para tratar cáncer en un sujeto que lo necesite. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto proporcionado. El término “cáncer” incluye enfermedades o trastornos que implican un crecimiento y/o proliferación celular anormales. En algunas realizaciones, un cáncer tratado según la presente invención es, a modo de ejemplo no limitativo, glioma, carcinoma de tiroides, carcinoma de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico), carcinoma gástrico, carcinoma cervical, melanoma, carcinoma de piel, carcinoma colorrectal, tumores del estroma gastrointestinal, carcinoma de páncreas, carcinoma de conducto biliar, carcinoma de ovario, carcinoma de endometrio, carcinoma de próstata, carcinoma de células renales, linfoma anaplásico de células grandes, leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda, leucemia de

células T, leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, mesotelioma maligno, melanoma maligno, cáncer de colon (por ejemplo, cáncer colorrectal de alta inestabilidad de microsatélites).

En otro aspecto, los cánceres son cánceres hematológicos. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto proporcionado. La expresión “cáncer hematológico” incluye tumores transmitidos por la sangre y enfermedades o trastornos que implican un crecimiento y/o proliferación celular anormal en tejidos de origen hematopoyético, tales como linfomas, leucemias y mielomas. Los cánceres hematológicos que pueden tratarse según la invención incluyen, a modo de ejemplo no limitativo, linfoma anaplásico de células grandes, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B (por ejemplo, linfoma difuso de células B grandes de tipo ABC, linfoma difuso de células B grandes de tipo GCB), linfoma de células T, linfoma de células del manto, linfoma histiocítico, leucemia de células T, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, y leucemia mieloblástica aguda, leucemia de células plasmáticas.

Como se usa aquí, la expresión “afección precancerosa” significa una afección, crecimiento anormal de tejido, o lesión que tiende o es probable que se vuelva cancerosa. Las afecciones precancerosas incluyen, por ejemplo, queratosis actínica, pólipos adenomatosos del colon, displasia cervical, y trastornos hematológicos antecedentes tales como mielofibrosis, anemia aplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna, policitemia vera, y síndrome mielodisplásico.

Ensayos

Para desarrollar inhibidores útiles del crecimiento, la proliferación o la supervivencia del cáncer, se pueden identificar *in vitro* inhibidores candidatos capaces de disminuir las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF. La actividad de los compuestos proporcionados puede ensayarse utilizando métodos conocidos en la técnica y/o los métodos presentados aquí.

Los compuestos que disminuyen las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF pueden identificarse y ensayarse usando PDK1 biológicamente activa y otros elementos de estas rutas, ya sean recombinantes o de origen natural. PDK1, RSK2 y Akt, por ejemplo, se pueden encontrar en células nativas, aisladas *in vitro*, o coexpresadas o expresadas en una célula. La medida de la reducción en las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF en presencia de un inhibidor, con respecto a la actividad en ausencia del inhibidor, se puede realizar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como en los ensayos descritos aquí. Se conocen en la técnica otros métodos para ensayar la actividad de elementos de rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF. La selección de métodos de ensayo apropiados está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

Los compuestos pueden ensayarse adicionalmente en modelos celulares o modelos animales para determinar su capacidad para provocar un cambio detectable en el fenotipo relacionado con las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF. Además de los cultivos celulares, se pueden usar modelos animales para ensayar inhibidores de PDK1 para determinar su capacidad para tratar cáncer en un modelo animal.

Los compuestos pueden ensayarse adicionalmente para determinar su capacidad para inhibir o inducir selectivamente la expresión de genes o proteínas que podrían servir como biomarcadores para monitorizar la inhibición de la actividad de PDK1 en modelos animales o en sujetos o pacientes sanos.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto proporcionado, opcionalmente en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un vehículo).

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas incluyen isómeros ópticos, diastereómeros, o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos aquí. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen una sal farmacéuticamente aceptable. Un compuesto incluido en la composición farmacéutica puede unirse covalentemente a un vehículo farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, el compuesto de la invención incluido en la composición farmacéutica no está unido covalentemente a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable”, como se usa aquí, se refiere a excipientes farmacéuticos, por ejemplo, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas, farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables, adecuadas para aplicación enteral o parenteral que no reaccionan de manera perjudicial con los compuestos usados según los métodos proporcionados. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, disoluciones salinas (tal como la disolución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, e hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, y polivinilpirrolidina. Tales preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, amortiguadores, colorantes, y/o sustancias

aromáticas, y similares, que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos usados según los métodos proporcionados.

- 5 Los compuestos proporcionados se pueden administrar solos o se pueden coadministrar a un paciente junto con uno o más de otros fármacos. La coadministración pretende incluir la administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). En algunas realizaciones, las preparaciones se combinan con otras sustancias activas (por ejemplo, para reducir la degradación metabólica).

Formulaciones

- 10 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse y administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación oral, parenteral y tópica. En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados se administran mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal, o intraperitoneal). En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí se administran por inhalación, por ejemplo, intranasalmente. En algunas realizaciones, los compuestos proporcionados se administran por vía transdérmica. También se prevé que se puedan usar múltiples vías de administración (por ejemplo, intramuscular, oral, transdérmica) para administrar los compuestos de la invención. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos proporcionados y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 20 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos proporcionados, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. En algunas realizaciones, un vehículo sólido es una o más sustancias, que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, aglutinantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos, o un material encapsulante.

- 25 En algunas realizaciones, cuando la composición es un polvo, el vehículo es un sólido finamente dividido en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En algunas realizaciones, cuando la composición se formula para un comprimido, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

- 30 En algunas realizaciones, los polvos y comprimidos proporcionados contienen de 5% a 70% del compuesto activo. Los vehículos adecuados incluyen carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao, y similares. En algunas realizaciones, la composición se formula para un sello o pastilla. En algunas realizaciones, se utilizan comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y/o grageas como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

- 35 En algunas realizaciones, para preparar supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente en la misma. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y solidificar.

Las preparaciones en forma líquida incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo agua o disoluciones de agua/propilenglicol. En algunas realizaciones, para inyección parenteral, las preparaciones líquidas se pueden formular en disolución en una disolución acuosa de polietilenglicol.

- 40 Cuando se necesita o se desea una aplicación parenteral, las mezclas particularmente adecuadas para los compuestos de la invención son disoluciones estériles inyectables, preferiblemente disoluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluyendo supositorios. En particular, los vehículos para administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de dextrosa, disolución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros de bloques de polioxietileno, y similares. Las ampollas son dosis unitarias convenientes. Los compuestos de la invención también pueden incorporarse en liposomas o administrarse mediante bombas o parches transdérmicos. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para uso en la presente invención incluyen las descritas, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y en el documento WO 96/05309.

- 50 Se pueden preparar disoluciones acuosas adecuadas para uso oral disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, sabores, estabilizadores y agentes espesantes adecuados según se desee. Se pueden preparar suspensiones acuosas adecuadas para uso oral dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de suspensión bien conocidos.

- 55 También se incluyen preparaciones en forma sólida destinadas a la conversión poco antes de su uso en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizadores, amortiguadores, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes, y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas están en forma de dosis unitaria. En tal forma, la composición se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de una composición farmacéutica, tal como comprimidos envasados, cápsulas, y polvos en viales o ampollas. En algunas realizaciones, la forma de dosificación unitaria es una cápsula, comprimido, sello, o pastilla en sí misma, o es el número apropiado de cualquiera de estos en forma empaquetada.

La cantidad de componente activo en una forma de dosificación unitaria se puede variar o ajustar de 0,1 mg a 10000 mg, más típicamente 1,0 mg a 1000 mg, lo más típicamente 10 mg a 500 mg, según la aplicación particular y la potencia del componente activo. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas contienen otros agentes terapéuticos compatibles.

Algunos compuestos pueden tener una solubilidad limitada en agua y pueden requerir un tensioactivo u otro codisolvente apropiado en la composición. Dichos codisolventes incluyen: polisorbato 20, 60 y 80, Pluronic F-68, F-84 y P-103, ciclodextrina, y aceite de ricino polioxil 35. Dichos codisolventes se emplean típicamente a un nivel entre alrededor de 0,01% y alrededor de 2% en peso.

En algunas realizaciones, puede ser deseable una viscosidad mayor que la de las disoluciones acuosas simples para disminuir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación, y/o mejorar de otra manera la formulación. Dichos agentes que aumentan la viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales, ácido hialurónico y sus sales, y combinaciones de los anteriores. Dichos agentes se emplean típicamente a un nivel entre alrededor de 0,01% y alrededor de 2% en peso.

Las composiciones proporcionadas pueden incluir adicionalmente componentes para proporcionar una liberación sostenida y/o comodidad. Dichos componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos portadores de fármacos finamente divididos. Estos componentes se analizan con mayor detalle en las patentes U.S. nos 4.911.920; 5.403.841; 5.212.162; y 4.861.760.

Dosis eficaces

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas incluyen composiciones en las que el ingrediente activo está contenido en una cantidad terapéuticamente eficaz, es decir, en una cantidad eficaz para lograr su fin pretendido. La cantidad real eficaz para una aplicación particular dependerá, entre otros, de la afección que se está tratando. En ciertas realizaciones, cuando se administran en métodos para tratar cáncer, las composiciones proporcionadas contendrán una cantidad de ingrediente activo eficaz para lograr el resultado deseado (por ejemplo, disminuir el número de células cancerosas en un sujeto).

La dosis y la frecuencia (dosis únicas o múltiples) administradas a un mamífero pueden variar dependiendo de una variedad de factores, incluyendo una enfermedad que da como resultado un aumento de la actividad de las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, ya sea que el mamífero sufra de otra enfermedad, y su vía de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal, y dieta del receptor; naturaleza y alcance de los síntomas de la enfermedad que se está tratando (por ejemplo, cáncer), tipo de tratamiento concurrente, complicaciones de la enfermedad que se está tratando, u otros problemas relacionados con la salud. Se pueden usar otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos y compuestos de la invención.

Para cualquier compuesto descrito aquí, puede determinarse inicialmente una cantidad terapéuticamente eficaz a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones diana serán aquellas concentraciones del compuesto o compuestos activos que son capaces de reducir la actividad de las rutas de supervivencia celular dependientes de la interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, como se midió, por ejemplo, usando los métodos descritos aquí.

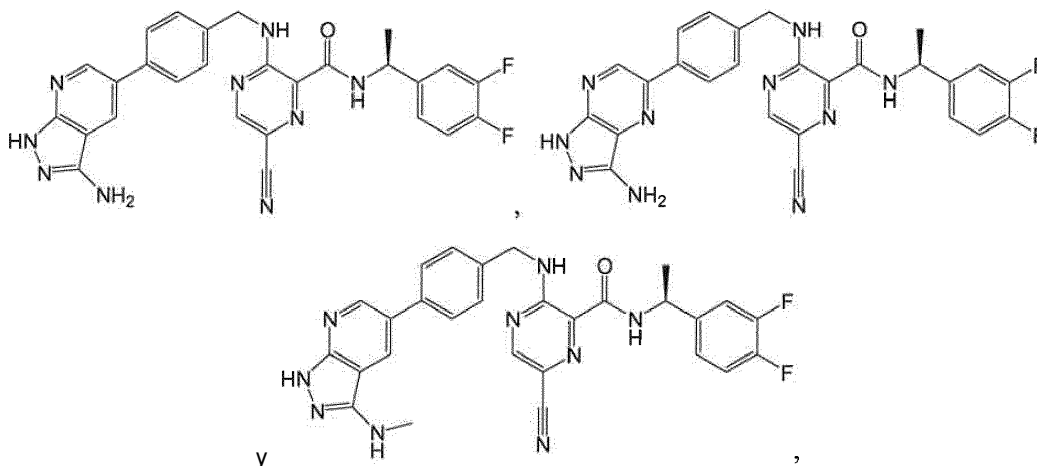
Las cantidades terapéuticamente eficaces para uso en seres humanos pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos para lograr una concentración que se ha demostrado que es eficaz en animales. La dosis en seres humanos se puede ajustar monitorizando la inhibición de PDK1 y ajustando la dosis hacia arriba o hacia abajo, como se describió anteriormente.

Las dosis se pueden variar dependiendo de las necesidades del paciente y del compuesto que se utilice. En algunas realizaciones, la dosis administrada a un paciente es suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso. En algunas realizaciones, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. A partir de entonces, la dosis se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo en las circunstancias. En una realización de la invención, el intervalo de dosificación es 0,001% a 10% p/v. En otra realización, el intervalo de dosificación es 0,1% a 5% p/v.

Combinaciones

También se describen aquí métodos que comprenden administrar un compuesto de Fórmula I o composiciones farmacéuticas proporcionadas aquí en combinación con uno o más segundos agentes activos, y/o en combinación con radioterapia o cirugía.

- 5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en una terapia combinada de tratamiento del cáncer en un sujeto, en la que el crecimiento o la proliferación del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende una formulación que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la terapia combinada comprende además una cantidad eficaz de un segundo agente anticanceroso.

Se describen aquí terapias en las que se puede administrar a un paciente una cantidad eficaz de una combinación de un compuesto de Fórmula I y un segundo agente anticanceroso. En tal terapia combinada, es posible administrar cantidades de cada uno de los agentes en la combinación que son subterapéuticas si dichos agentes se administraran solos, pero que en combinación, los agentes actúan de una manera aditiva o supraaditiva para ser terapéuticamente eficaces. Sin embargo, algunas combinaciones pueden emplear compuestos en cantidades que de otro modo se considerarían terapéuticamente eficaces por sí mismas, aunque la combinación demuestra ser más eficaz. En los cánceres, en particular, una combinación de agentes puede alterar un estándar de atención, de modo que un tratamiento que sea eficaz en algún subconjunto de pacientes se transforme en un nuevo estándar de atención que sea eficaz en un grupo más grande de pacientes, tal como prolongando la vida o logrando una mayor probabilidad de remisión.

Las combinaciones eficaces de compuestos de Fórmula I con otros agentes pueden identificarse a través de ensayos preclínicos y clínicos de las combinaciones, y dependerán de muchos factores, incluyendo el tipo de enfermedad y la etapa de desarrollo, la salud general del paciente, las toxicidades y los efectos secundarios de los agentes, y similares.

Los ejemplos de agentes anticancerosos quimioterapéuticos que pueden usarse como segundos agentes activos en combinación con el compuesto de Fórmula I incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, melfalán, ifosfamida), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato), inhibidores de la Aurora cinasa (por ejemplo, ZM447439, hesperidina, VX-680 AZD1152); antagonistas de purina y antagonistas de pirimidina (por ejemplo, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo (5-FU), citarabina (Ara-C), gemcitabina), venenos del huso (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel), podofilotoxinas (por ejemplo, etopósido, irinotecán, topotecán), antibióticos (por ejemplo, doxorubicina, daunorrubicina, bleomicina, mitomicina), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina), iones inorgánicos (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, carboplatino), enzimas (por ejemplo, asparaginasa), hormonas (por ejemplo, tamoxifeno, leuprolida, flutamida y megestrol), inhibidores o venenos de la topoisomerasa II, inhibidores de EGFR (Her1, ErbB-1) (por ejemplo, gefitinib), anticuerpos (por ejemplo, bevacizumab, rituximab), IMiD (por ejemplo, talidomida, lenalidomida), diversos agentes dirigidos (por ejemplo, inhibidores de HDAC tal como vorinostat), inhibidores de Bcl-2, inhibidores de VEGF, inhibidores de proteasoma (por ejemplo, bortezomib), inhibidores de cinasas dependientes de ciclina (cdk) (por ejemplo, seliciclib), derivados de quinolona (por ejemplo, vosaroxina), y dexametasona.

En otras realizaciones, los compuestos de Fórmula I pueden usarse en terapia de combinación con inhibidores de PDK1, por ejemplo GSK2334470 (GlaxoSmithKline), BX-795, BX-912 y BX-320 (Berlex); inhibidores de Akt, por ejemplo MK-2206 (Merck); Inhibidores de PI3K, por ejemplo GDC-0941 (pictilisib, Genentech), idelalisib (Gilead); inhibidores de BTK, por ejemplo GS-4059 (Gilead).

En el tratamiento de tumores hematológicos y sólidos, los segundos agentes pueden incluir inhibidores de PD-1/PD-L1, por ejemplo nivolumab (Opdivo), pembrolizumab (Keytruda, MK-3475), pidilizumab (CT-011), BMS 936559, y

MPDL3280A; inhibidores de CTLA-4, por ejemplo ipilimumab (Yervoy) y tremelimumab; e inhibidores de fosfatidilserina, por ejemplo bavituximab (PGN401).

En el tratamiento de la leucemia mielógena aguda, los segundos agentes incluyen, por ejemplo, citarabina (ara-C), daunorrubicina y vosaroxina.

- 5 En el tratamiento de la CLL, los segundos agentes incluyen, por ejemplo, PCI-32765 (ibrutinib).

En el tratamiento de mielomas, los segundos agentes incluyen, por ejemplo, lenalidomida (Revlimid®) y bortezomib (Velcade®).

EQUIVALENTES

- 10 Los ejemplos representativos que siguen están destinados a ayudar a ilustrar la invención, y no pretenden, ni deben interpretarse, que limitan el alcance de la invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención y muchas otras realizaciones de la misma, además de las mostradas y descritas aquí, resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir del contenido completo de este documento, incluyendo los ejemplos que siguen y las referencias a las publicaciones científicas y la bibliografía de patentes citadas aquí.

- 15 Se apreciará que para las preparaciones de compuestos descritas aquí, cuando se usa HPLC de fase inversa para purificar un compuesto, un compuesto puede existir como una sal de ácido mono-, di- o tri-trifluoroacético.

Se apreciará además que la presente invención contempla compuestos individuales descritos aquí. Cuando los compuestos individuales ejemplificados se aíslan y/o caracterizan como una sal, por ejemplo como una sal de ácido trifluoroacético, la presente invención contempla una base libre de la sal, así como otras sales farmacéuticamente aceptables de la base libre.

- 20 Los siguientes ejemplos contienen información adicional importante, ejemplificación y orientación que pueden adaptarse a la práctica de esta invención.

EJEMPLOS

- 25 Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que los compuestos de Fórmula I se unen a la conformación inactiva de PDK1 ($IC_{50} < 20$ nM). Los compuestos se unen profundamente en el bolsillo adaptativo (alostérico), provocando una distorsión en el dominio N-terminal, perturbando así el bolsillo de PIF y modulando así negativamente la unión al sustrato independiente de PI. El Compuesto 2, por ejemplo, se ha evaluado en un panel de más de 20 líneas celulares derivadas de cánceres hematológicos que incluyen leucemia mielógena aguda, mieloma múltiple, DLBCL, y linfoma de células del manto, y muestra una fuerte actividad antiproliferativa con $EC_{50} = 3-900$ nM. La actividad antiproliferativa se correlacionó con la modulación de la ruta evaluada mediante la inhibición de la fosforilación de PDK1, RSK2 y AKT. Curiosamente, la inhibición de la fosforilación de PDK1 dependió del tiempo, mostrando 2-5 veces más inhibición después de 24 horas que 4 horas. Además, el Compuesto 2 produjo una apoptosis sustancial después de 24 horas. El Compuesto 2 se comparó con el inhibidor de PDK1 GSK2334470, mostrando una potencia bioquímica comparable, pero el Compuesto 2 fue 10 a 30 veces más potente para inhibir la fosforilación de PDK1 y RSK2 en todas las líneas celulares ensayadas. Además, el Compuesto 2 fue al menos 10 veces más potente que GSK2334470 en ensayos de viabilidad a las 72 horas.

- 35 En ratones, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 están biodisponibles por vía oral (%F > 40%) con una T_{max} de 4-8 horas y vida media larga. La modulación de la ruta se evaluó in vivo usando xenoinjertos MV4-11 en ratones. Se observó una potente modulación de la ruta a las 4 horas y 24 horas después de una única dosis oral del Compuesto 1 y del Compuesto 2. La eficacia se evaluó mediante la dosificación de 21 días en xenoinjertos MV4-11. Tanto el Compuesto 1 como el Compuesto 2 muestran una eficacia relacionada con la dosis, alcanzando TGI 96-97% y una regresión parcial en el 70-100% de los animales a la dosis más alta.

- 40 Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que la selección como diana de la conformación inactiva de PDK1 y la inhibición de la unión al sustrato independiente de PI tiene un amplio potencial para el tratamiento de cánceres sólidos y hematológicos, especialmente en contextos en los que los inhibidores de la cinasa PDK1 o los inhibidores de Akt son insuficientemente eficaces.

Ejemplo 1 - Ensayo de actividad de la cinasa PDK1

- 45 La proteína PDK1 de longitud completa (SignalChem) se desfosforiló utilizando GST-λ-fosfatasa (producida en nuestras instalaciones), que posteriormente se eliminó utilizando perlas de glutatona-agarosa (Gold Biotechnology). Se incubó AKT Ser476Asp de longitud completa (5 nM) con PDK1 (40 pM fosforilada o 100 pM no fosforilada), FITC-Crosstide 100 nM (péptido GSK-3 Ser 21, CGSGSGRPRPTSSFAEG (SEQ ID NO.: 1); ThermoFisher) y ATP 24 μM durante 2 h en Tris 10 mM (pH 7,5) que contiene $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 al 0,01%, y ditiotreitól (DTT) 1 mM, en presencia o ausencia de compuestos de ensayo, que se añadieron utilizando un dispensador acústico Echo 555 (Labcyte). A continuación, se añadió anticuerpo Tb-pCrosstide (ThermoFisher) hasta una concentración final de 2 nM,

y la reacción se incubó durante 30 min adicionales. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) se midió usando un lector de placas Tecan Infinite F500 con $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em1}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em2}} = 520 \text{ nm}$.

Las Figuras 2A y 2B muestran las curvas de inhibición de la actividad de la cinasa PDK1 en este ensayo para el Compuesto 1 y el Compuesto 2. Los valores insertados en cada gráfico proporcionan los valores de IC_{50} . Estos datos confirman que los compuestos representativos de Fórmula I son potentes inhibidores de PDK1 tanto fosforilada como no fosforilada.

Ejemplo 2 - Selectividad

La selectividad del Compuesto 1 y el Compuesto 2 se evaluó en un panel de 270 cinasas humanas diferentes ofrecidas por Upstate (ahora Millipore). Los compuestos se ensayaron a una concentración de $10 \mu\text{M}$ y mostraron una inhibición mayor o igual a 90% para 20 cinasas (incluyendo PDK1) para el Compuesto 2 y 18 cinasas (incluyendo PDK1) para el Compuesto 1, demostrando una gran selectividad (inhibición de menos de 10% de kinoma) a esta alta concentración (más de 1.000 veces la concentración de IC_{50} para PDK1).

Ejemplo 3 - Ensayo de proliferación celular (MTS)

La proliferación celular se midió usando el Ensayo de Proliferación Celular No Radiactivo Acuoso CellTiter 96 (Promega). El ensayo CellTiter 96® Aqueous se compone de disoluciones de un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio, sal interior; MTS] y un reactivo de acoplamiento de electrones (metosulfato de fenazina) PMS. La MTS es biorreducida por las células en un producto de formazán que es soluble en medio de cultivo de tejidos. La absorbancia del producto de formazán a 490 nm se puede medir directamente en las placas de ensayo sin procesamiento adicional. La cantidad de producto de formazán como se midió por la cantidad de absorbancia de 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo. Las células se sembraron en placas transparentes de 96 o 384 pocillos en un volumen de $200 \mu\text{l}$ (96 pocillos) o $50 \mu\text{l}$ (384 pocillos) a densidades optimizadas que oscilan desde 1.000 a 40.000 células por pocillo para placas de 96 pocillos o 1.200 a 25.000 células por pocillo para placas de 384 pocillos según la línea celular. Después de 4-6 horas de recuperación, se añadieron compuestos diluidos en serie en DMSO a las células usando (concentración final de DMSO al 0,1% v/v). Después, las células se cultivaron a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO_2 durante 72 h. Una disolución 20:1 de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio] (MTS):metosulfato de fenazina (PMS) en DPBS se preparó inmediatamente antes del uso, se añadió a cada pocillo, y las células se incubaron durante 1,5 h a 37°C . Después se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas. Los valores de absorbancia se normalizaron como porcentaje del control (células incubadas en presencia de DMSO al 0,1% v/v). Las curvas de respuesta frente a las dosis sigmoideas se trazaron utilizando log (inhibidor) frente a respuesta - modelo de pendiente variable (cuatro parámetros) con un valor máximo limitado al 100% (GraphPad Prism versión 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). El valor inferior se limitó a 0% para los compuestos que no alcanzaron una meseta en un intervalo de concentración más alto. Las curvas para los compuestos que alcanzaron una meseta se hicieron coincidir exactamente con los puntos de medida. Para curvas que alcanzan una meseta alta (> 20%), la EC_{50} se da a conocer como la concentración que da como resultado una inhibición del 50% del crecimiento celular. Para determinar el potencial de los compuestos de la invención para afectar la viabilidad de cánceres hematológicos, se seleccionaron y ensayaron líneas celulares que representan diversos tipos de tumores. Las líneas celulares humanas ensayadas fueron: MOLM-13 (leucemia mieloide aguda (AML)), MV4-11 (AML), U-2932 (linfoma difuso de células B grandes de tipo ABC), U-937 (linfoma histiocítico), U-266 (mieloma múltiple), RPMI-8226 (mieloma múltiple), CMK (línea celular megacarioblástica), SU-DHL-4 (linfoma difuso de células B grandes de tipo GCB), KG1 (AML), Mec-1 (leucemia crónica de células B), MOLM-16 (AML), Jeko (linfoma de células B), WSU-DLCL2 (linfoma de células B), JJN3 (leucemia de células plasmáticas), SU-DHL-6 (linfoma difuso de células B grandes de tipo GCB), y Z-138 (linfoma de células del manto). Además, se ensayaron dos líneas celulares murinas: A20 (AML) y C1498 (linfoma difuso de células B grandes de tipo ABC). Se ensayaron el Compuesto 3, el Compuesto 1, el Compuesto 2, GSK-2334470 (inhibidor de PDK1, GlaxoSmithKline, Figuras 12A-12E), MK-2206 (inhibidor de AKT; Merck), y GDC-0941 (pictilisib; inhibidor de pan-PI3K; Genentech) para determinar el efecto en este ensayo. Los compuestos representativos Compuesto 3, Compuesto 1 y Compuesto 2 demostraron una potente inhibición de la proliferación celular con EC_{50} entre 3 nM y 853 nM contra las diversas líneas celulares, lo que indica un efecto amplio en los tipos de tumores (Tabla 1).

Tabla 1

Ensayo de proliferación MTS (μM)	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
Molm-13	0,006	0,003	0,005
MV4-11	0,005	0,007	0,012
U-2932	0,108	0,056	0,115
U-937	0,123	0,074	0,111

Ensayo de proliferación MTS (μM)	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
U-266	0,226	0,130	0,145
RPMI-8226	0,174	0,163	0,201
CMK	0,222	0,182	0,278
SU-DHL-4	0,313	0,186	0,411
KG1	0,175	0,195	0,193
Mec-1	0,415	0,215	0,403
MOLM-16	0,248	0,227	0,291
Jeko	0,286	0,279	0,249
WSU-DLCL2	0,543	0,354	0,474
JJN3	0,846	0,453	0,853
SU-DHL-6	0,572	0,476	0,458
Z-138	0,718	0,684	0,754

Como se muestra en la Figura 3, los compuestos MK-2206 y GDC-0941 mostraron una variabilidad sustancial en la potencia en el ensayo de proliferación celular, oscilando las actividades desde 0,1 μM a 10,7 μM ($\text{EC}_{50} > 1 \mu\text{M}$ para 9 de 16 líneas celulares) para MK-2206, y oscilando desde 0,05 μM a 6,1 μM ($\text{EC}_{50} > 1 \mu\text{M}$ para 3 de las 16 líneas celulares) para GDC-0941. Esto contrasta con las potencias observadas para el Compuesto 2, que muestra inhibición del crecimiento de todas las líneas celulares a concentraciones inferiores a 1 μM , y en la mayoría de los casos a concentraciones inferiores a 500 nM (15 de 16 líneas celulares). Estos datos sugieren que los compuestos de la invención pueden ser útiles en una variedad de tumores que son menos susceptibles a inhibidores que se dirigen a otras cinasas en la misma ruta, siendo potencialmente útiles como sustancias terapéuticas de primera línea o como sustancias terapéuticas de rescate en casos en los que otros inhibidores de cinasas son o se vuelven tratamientos ineficaces.

Ejemplo 4 - Ensayo de proliferación celular (MTS)

Para un subconjunto de líneas celulares, los compuestos de Fórmula I representativos se compararon con GSK2334470 y se investigaron con más detalle. La Tabla 2 muestra los datos de EC_{50} comparativos para los diversos compuestos para la inhibición de la proliferación celular en siete líneas celulares. En la mayoría de los casos (6 de 7 líneas celulares), el compuesto de ensayo oscila de 7 a 50 veces más potente que GSK2334470.

Tabla 2

Ensayo de proliferación MTS (μM)	Compuesto 1	Compuesto 2	MK-2206	GSK-2334470
Molm-13	0,006	0,003	1,369	0,360
MV4-11	0,005	0,007	1,300	0,105
U-2932	0,108	0,056	4,880	0,986
RPMI-8226	0,174	0,163	0,906	2,900
Jeko	0,286	0,279	0,980	2,250
A20	0,156	0,114	0,138	0,49
C1498	0,053	0,045	0,812	0,358

Un examen más detallado de las curvas de inhibición del crecimiento muestra que los compuestos de ensayo producen mesetas bajas (<20%, como se observa para la doxorubicina, un fármaco anticanceroso ampliamente utilizado y eficaz) a concentraciones más altas que indican una muerte celular (quedan menos células después de 72 h que las

que se sembraron en placas al principio del experimento) probablemente por inducción de apoptosis (Figuras 4A-4D). Por el contrario, las curvas para GSK2334470 y MK-2206 no alcanzan una meseta por debajo del 20% para MV4-11 y C1498, lo que sugiere que estos compuestos inhiben parcialmente el crecimiento celular pero no inducen la muerte celular. Los fármacos contra el cáncer eficaces inducen la inhibición del crecimiento indicativa de muerte celular (como se ilustra por la doxorubicina en las Figuras 4A-4D y 5A-5C). Estos datos sugieren que los compuestos de Fórmula I pueden tener utilidad como agentes anticancerosos.

Ejemplo 5 - Inducción de apoptosis

La inducción de la apoptosis se evaluó usando un kit Alexa Fluor 488 Annexin 5/Dead Cell Apoptosis para citometría de flujo (Life Technologies) esencialmente según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de seis pocillos en 3 ml de medio de crecimiento completo (3×10^5 células/pocillo), y se dejaron equilibrar durante 1 h a 37°C en una incubadora humidificada con 5% de CO₂. Se añadió DMSO (control), compuesto de ensayo, o doxorubicina a los pocillos (concentración final de DMSO al 0,1%). Las células se devolvieron a la incubadora durante 24 h. El día del análisis, se marcaron 1×10^5 células según las instrucciones del fabricante, y se analizaron mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur™, GH) para determinar el porcentaje de células apoptóticas (positivas a anexina V, AV+) y/o células muertas apoptóticas (AV+ y positivas a yoduro de propidio (PI+)).

Este ejemplo muestra que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 son eficientes induciendo apoptosis a concentraciones tan bajas como 50 nM, lo cual es consistente con los datos de inhibición del crecimiento de la Figura 3, que muestra una meseta bastante por debajo del 20% en el intervalo de 50-100 nM. Por el contrario, GSK-2334470 no muestra signos de inducción de apoptosis incluso a concentraciones tan altas como 300 nM.

Ejemplo 6 - Análisis de transferencia Western

Para los análisis de fosfoproteínas, las células se sembraron en placas de Petri de 10 cm (10×10^6 células/placa) en medio suplementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomicina. Después de que las células se recuperaran durante 1 h a 37°C, los compuestos se añadieron en DMSO (0,1% final) y se incubaron durante 4 o 24 h a 37°C. A continuación, las células se recogieron mediante centrifugación y se lavaron con PBS fría. Los peletes celulares se resuspendieron en amortiguador de extracción celular (Invitrogen) complementado con cóctel inhibidor de fosfatasa y proteasa 2X Halt™ (Thermo Scientific), ortovanadato de sodio 2 mM, EDTA 10 mM, y PMSF 4 mM. Las muestras se lisaron mediante ultrasonidos, y se incubaron en hielo durante 30 min. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación, y las concentraciones de proteínas se determinaron utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce). El lisado clarificado se diluyó en amortiguador de muestra LDS con agente reductor (Life Technologies). Después de calentar a 70°C, las muestras se enfriaron y se cargaron en geles Bis-Tris al 4-12% (Life Technologies) a 50 µg/pocillo. Los geles se procesaron a 110 V, y las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF. Las membranas se bloquearon en amortiguador de bloqueo TBS (Li-Cor Biosciences) durante 1 h. Se añadieron anticuerpos primarios (Cell Signaling, Sant Cruz Biotechnology) (dilución 1:1.000) en amortiguador de bloqueo con 0,1% de Tween-20 y dilución 1:20.000 de anticuerpo β-actina, y se incubaron durante 14 h a 4°C. Las transferencias se lavaron en TBS-T. Se añadió anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con marcador (IRDye® 800CW; Li-Cor Biosciences) en amortiguador de bloqueo con 0,1% de Tween-20 y 0,02% de SDS, y se incubó durante 1 h. Después de lavar en TBS-T seguido de TBS, las membranas se escanearon en un sistema de formación de imágenes Odyssey (Li-Cor Biosciences). Las bandas se cuantificaron usando ImageJ.

La Figura 6A muestra que el Compuesto 2 y GSK-2334470 modulan cada uno la fosforilación de PDK1 y RSK2. La Figura 6C muestra que el Compuesto 2 parece ser 10 veces más potente que GSK-2334470 inhibiendo la fosforilación tanto de PDK1 como RSK2 (véase la línea de puntos en la Figura 5B). La Figura 6C muestra que la inhibición de la fosforilación de RSK2 por el Compuesto 2 (30 nM) parece ser potente e independiente del tiempo, mientras que GSK2334470 a la misma concentración tiene poco o ningún efecto sobre la fosforilación de RSK2. Por el contrario, la inhibición de la fosforilación de PDK1 depende del tiempo para ambos compuestos, mostrando el Compuesto 2 una disminución de 5 veces en la fosforilación de PDK1 entre una exposición de 4 h y 24 h, lo que sugiere que la desfosforilación de PDK1 es un proceso lento que requiere una ocupación prolongada de PDK1. Cabe señalar que PDK1 se activa por autofosforilación y de este modo, una vez que PDK1 se desfosforila mientras que el inhibidor está todavía presente, la ruta se cerrará por completo. A una concentración de 100 nM, el Compuesto 2 logra un 90% de inhibición de P-PDK1 y >95% de inhibición de P-RSK2, mientras que GSK2334470 solo logra un 70% y 55% de inhibición, respectivamente, a la misma concentración. Esta discrepancia puede explicar por qué el Compuesto 2 induce la apoptosis a 100 nM mientras que GSK2334470 solo logra una inhibición parcial del crecimiento sin evidencia de apoptosis. En los datos no mostrados, solo se observó una señal débil de AKT-T308. Obsérvese que el inhibidor de Akt MK-2206 no fue eficaz en el ensayo de proliferación celular MTS descrito en el Ejemplo 4 anterior, lo que sugiere que la supervivencia mediada por PDK1 en esta línea celular pasa principalmente por RSK2. Esto es consistente con los datos de la bibliografía que muestran que el ARNip de RSK2 inhibe el crecimiento de las células MV4-11 y desencadena la apoptosis (Elf et al., Blood, 2011, 117(25):6885-6894).

Las Figuras 7A-C muestran que la línea celular de linfoma de células B C1498 (tipo ABC) es sensible al Compuesto 2, mostrando >90% de inhibición de P-RSK2 y ~80% de inhibición de P-PDK1 en el intervalo de 30-100 nM. El efecto de GSK2334470 es mucho más débil, alcanzando aproximadamente un 75% de inhibición tanto de P-PDK1 como de P-RSK2 a 300 nM. De manera correspondiente, el Compuesto 2 muestra una inhibición del crecimiento del 80% a 200

nM, mientras que GSK2334470 no logra este efecto hasta una concentración de 5-10 μ M. Al igual que MV4-11, C1498 no muestra fosforilación significativa de AKT o IKK, lo que sugiere que la supervivencia mediada por PDK1 pasa principalmente por RSK2. Curiosamente, el tratamiento con el inhibidor de AKT MK-2206 parece mejorar la fosforilación de PDK1 y RSK2.

- 5 Las Figuras 8A-8E muestran que la célula de AML A20 es menos sensible al Compuesto 2, ya que se requiere una concentración de 300 nM de compuesto para lograr >90% de inhibición de P-RSK2, y que P-PDK se establece a una inhibición del 70%. Esto es consistente con unas EC_{50} sustancialmente mayores en el ensayo de proliferación en comparación con MV4-11 y C1498. Las células A20 son incluso menos sensibles a GSK2334470, mostrando solo una inhibición de P-PDK1 del 45% a la concentración más alta. A diferencia de las líneas celulares anteriores, A20 muestra activación de AKT, y los niveles de P-AKT son sensibles al inhibidor de AKT MK-2206. Esto es consistente con la potente inhibición del crecimiento por MK-2206 como se muestra en la Figura 3. Los niveles de P-AKT también son sensibles al Compuesto 2 mientras que apenas se ven afectados por GSK2334470. Estos datos muestran una clara correlación entre la modulación de la ruta por el Compuesto 2 y MK-2206 y la inhibición del crecimiento celular, mientras que GSK2334470 solo muestra un efecto moderado en los dos ensayos.
- 10
- 15 Las Figuras 9A-C muestran que la línea celular KG-1 es sensible al Compuesto 1, con una inhibición de >80% de los niveles de pRSK2 y pPDK1 a 100 nM de compuesto. Al igual que la línea celular C1498, las células KG-1 no muestran una fosforilación de AKT significativa.

- Tomados en conjunto, los datos indican que puede ser necesario un 70-80% de inhibición de P-PDK1 y >90% de inhibición de P-RSK2 para inhibir eficazmente la proliferación celular y desencadenar potencialmente la apoptosis. De forma importante, la inhibición del crecimiento y la apoptosis no requieren la inhibición de AKT e IKK en varias líneas celulares, sino que apuntan a P-RSK2 como un impulsor clave de la supervivencia celular. Este es un hallazgo inesperado, pero destaca el importante potencial anticanceroso de los compuestos de Fórmula I. Si bien GSK2334470 puede inhibir claramente la P-PDK1 en las células, el compuesto es típicamente 10-30 veces menos potente en los ensayos de inhibición del crecimiento y modulación de la ruta en comparación con el Compuesto 2. Lo mismo es cierto para la inhibición de P-RSK2, que alcanza 65-85% a la concentración más alta ensayada. Esto puede explicar por qué GSK2334470 no ha demostrado eficacia en estudios con animales y no ha avanzado como candidato a fármaco.
- 20
- 25

El Compuesto 1 también se evaluó en los ensayos anteriores, proporcionando resultados similares a los descritos para el Compuesto 2.

Ejemplo 7 - Modulación de la ruta en xenoinjertos tumorales

- 30 Las células MV4-11 propagadas in vitro se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones hembras NCr nu/nu de 9 semanas. El día del implante, las células MV4-11 se recolectaron durante el crecimiento en fase logarítmica y se resuspendieron en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS) que contenía 50% de Matrigel™ (BD Biosciences) a una concentración de 1×10^8 células/ml. Los xenoinjertos se iniciaron mediante la implantación subcutánea de 1×10^7 células MV-4-11 (0,1 ml de suspensión) en el flanco derecho de cada animal de ensayo, y los tumores se monitorizaron a medida que sus volúmenes se acercaban al intervalo diana de 175 a 225 mm³. Dos semanas después de la implantación, los animales se asignaron a grupos individuales de 3 animales con un volumen tumoral medio de aproximadamente 200 mm³. Los animales se dosificaron por sonda oral con 5 ml/kg de vehículo (1% de DMA/99% de Labrasol), Compuesto 1 (en 1% de DMA/99% de Labrasol), Compuesto 2 (en 1% de DMA/99% de Labrasol), GDC0941 (en 0,5% de metilcelulosa:0,2% de Tween 80 en agua desionizada) y mediante inyección intraperitoneal (10 ml/kg) de GSK2334470 (en 1% de DMSO, 20% de PEG400, pH 4,2). Las concentraciones de dosificación reales se muestran en las Figuras 10A-10D. Ocho horas después de la dosis, se recogió el volumen de sangre completa mediante punción cardíaca bajo anestesia con isoflurano, y los tumores se extirparon y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Los tumores se pulverizaron en nitrógeno líquido usando un biopulverizador y se dividieron en dos tubos de muestra: uno para el análisis de transferencia Western y otro para el análisis de los niveles de compuesto por LC-MS/MS. El análisis de transferencia Western se realizó como se describió anteriormente. Para el análisis de MS, las muestras de tumores se homogeneizaron con un homogeneizador ultrasónico Virsonic 100. Primero se pesó cada muestra, y después se añadió un volumen apropiado de metanol:agua 20:80 para obtener una muestra de 9 ml/gramo. A continuación, las muestras se homogeneizaron en hielo, y se almacenaron congeladas hasta su análisis. Los patrones se prepararon en plasma de ratón BALB/c o tejido tumoral homogeneizado en blanco. Los patrones y las muestras se analizaron en un instrumento PE Sciex API4000, y la concentración de compuesto se cuantificó y se calculó de nuevo a ng de compuesto por g de tejido tumoral y se convirtió a una concentración de μ M suponiendo que 1 g de tejido tumoral equivale a 1 ml de volumen.
- 35
- 40
- 45
- 50

- Se injertaron tumores MV4-11 en ratones para evaluar la utilidad de compuestos representativos de Fórmula I como moduladores de la señalización de PDK1 en tumores in vivo. Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 inhiben PDK1 en tumores MV4-11 4 h y 8 h después de una única alimentación por sonda oral del compuesto. La inhibición depende de la dosis y es más fuerte a las 8 h, alcanzando un 50-60% de inhibición de la fosforilación de PDK1 a la concentración más alta y refleja la inhibición dependiente del tiempo de P-PDK1 observada en células in vitro. La inhibición de P-PDK1 da como resultado una fuerte supresión de la fosforilación de RSK2 y AKT con hasta un 80-90% de inhibición 8 h después de la dosis (Figuras 10C-D). Las concentraciones de Compuesto 1 y
- 55
- 60

Compuesto 2 en tumores corresponden aproximadamente a las dosis administradas. El inhibidor de PI3K GDC0941 produce un 45% de inhibición de PDK1 a las 8 horas, pero solo una modesta inhibición del 25% de P-PDK1 y ninguna inhibición de P-AKT. A pesar de la alta dosis de 50 mg/kg de GDC0941, la exposición tumoral fue de solo 0,4-1,4 mM, comparable a la exposición alcanzada con la dosis de 1 mg/kg de Compuesto 1 y Compuesto 2. Según esta observación, los efectos de modulación de la ruta observados para 50 mg/kg de GDC0941 fueron comparables a los de 1 mg/kg de Compuesto 1 o Compuesto 2. El inhibidor de PDK1 GSK2334470, dosificado IP a 50 mg/kg, mostró una modulación de la ruta y exposición tumoral comparable a la de 50 mg/kg de GDC0941 y 1 mg/kg de Compuesto 1 o Compuesto 2.

Los datos de estos experimentos muestran que los compuestos de Fórmula I son capaces de producir una fuerte modulación de la ruta de PDK1 en tumores in vivo a dosis que son fisiológicamente relevantes para el tratamiento de cánceres humanos, subrayando así la utilidad de los compuestos de la invención como terapias potenciales para el cáncer humano. Además, los efectos de los compuestos de Fórmula I se comparan muy favorablemente con otros compuestos que se dirigen contra la actividad de PDK1 o la ruta de PI3K.

Ejemplo 8 - Eficacia del xenoinjerto tumoral

1. Las células MV4-11 se propagaron in vitro y se implantaron subcutáneamente en el flanco derecho de ratones hembras NCr nu/nu de 9 semanas como se describe en el Ejemplo 7. A los animales se les administró agua a voluntad (ósmosis inversa, 1 ppm de Cl), y NIH 31 Lab Diet® modificada e irradiada que consiste en 18,0% de proteína bruta, 5,0% de grasa bruta, y 5,0% de fibra bruta. Catorce días después de la implantación del tumor, designado como el Día 1 del estudio, los animales se clasificaron en siete grupos, cada uno de los cuales consistía en diez ratones con volúmenes tumorales individuales de 108 a 288 mm³ y volúmenes tumorales medios del grupo (MTV) de 162 a 165 mm³. El Día 1 del estudio, la dosificación por sonda oral se inició de la siguiente manera: el volumen de dosificación fue 0,100 ml por 20 gramos de peso corporal (5 ml/kg) y se ajustó al peso corporal de cada animal individual. Los ratones del Grupo 1 recibieron vehículo y sirvieron como grupo de control. Los Grupos 2-4 recibieron el Compuesto 1 a 5, 11 y 25 mg/kg, respectivamente, una vez al día x 21. Los Grupos 5-7 recibieron el Compuesto 2 a 5, 11 y 25 mg/kg, respectivamente, una vez al día x 21. Se prepararon semanalmente disoluciones de dosificación disolviendo la cantidad apropiada de polvo en dimetilnitrosamina (DMA) al 1% en Labrasol® (vehículo) para producir una disolución de 5 mg/ml. La disolución de 5 mg/ml proporcionó la dosis de 25 mg/kg en un volumen de dosificación de 5 ml/kg. Se diluyó una alícuota de la disolución de 5 mg/ml en el vehículo hasta concentraciones de 2,2 y 1 mg/ml que proporcionaron las dosis de 11 y 5 mg/kg, respectivamente, en un volumen de dosificación de 5 ml/kg.

Los tumores se midieron usando calibradores dos veces por semana. El criterio de valoración del estudio se definió como un volumen tumoral medio de 2000 mm³ en el grupo de control o 22 días, lo que ocurriera primero, y el estudio se terminó el Día 22. Los animales se pesaron diariamente los Días 1-5, después dos veces por semana hasta la finalización del estudio. Los ratones se observaron con frecuencia para detectar signos evidentes de cualquier efecto secundario adverso relacionado con el tratamiento (TR), y se registraron los signos clínicos cuando se observaron. Se monitorizó la pérdida de peso corporal individual según el protocolo, y se sacrificó a cualquier animal cuyo peso excediera los límites para una pérdida de peso corporal aceptable. La pérdida de peso corporal media del grupo también se monitorizó según el protocolo. La dosificación se suspendería en cualquier grupo cuyo peso excediera los límites para una pérdida de peso corporal media aceptable. Si se recupera el peso corporal medio, entonces se puede reanudar la dosificación en ese grupo, pero con una dosis menor o con un esquema de dosificación menos frecuente. La toxicidad aceptable se definió como una pérdida de peso corporal media del grupo de menos del 20% durante el estudio y no más del 10% de las muertes relacionadas con el tratamiento (TR). Cualquier régimen de dosificación que diera como resultado una mayor toxicidad se consideró por encima de la dosis máxima tolerada (MTD). Una muerte se clasificó como TR si era atribuible a los efectos secundarios del tratamiento según lo evidencian los signos clínicos y/o la necropsia, o también se puede clasificar como TR si se debe a causas desconocidas durante el período de dosificación o dentro de los 14 días posteriores a la última dosis. Una muerte se clasificó como no relacionada con el tratamiento (NTR) si no había evidencia de que la muerte estuviera relacionada con los efectos secundarios del tratamiento.

La eficacia del tratamiento se determinó utilizando datos del último día. Se determinó el MTV (n) (el volumen tumoral medio para el número de animales, n) el día final para cada grupo. Ratones del Grupo 1 que recibieron vehículo p.o. una vez al día x 21 sirvió como grupo de control para el análisis de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI) determinada según la fórmula %TGI = $[1 - (\text{MTV}_{\text{tratado con fármaco}} / \text{MTV}_{\text{control}})] \times 100$. La eficacia del tratamiento también se determinó a partir de la incidencia y magnitud de respuestas de regresión observadas durante el estudio. El tratamiento puede causar una regresión parcial (PR) o una regresión completa (CR) del tumor en un animal. En una respuesta de PR, el volumen del tumor fue 50% o menos de su volumen del Día 1 para tres medidas consecutivas durante el curso del estudio, e igual o mayor que 13,5 mm³ para una o más de estas tres medidas. En una respuesta de CR, el volumen del tumor fue menor que 13,5 mm³ durante tres medidas consecutivas durante el curso del estudio.

El Día 22, el MTV para el Grupo 1 fue 1421 mm³, con un intervalo de 650 a 2890 mm³ (Figuras 11A y 11B).

Respuesta al tratamiento con el Compuesto 1 (Grupos 2-4): el Día 22, las MTV para los Grupos 2-4 fueron 446, 288 y 63 mm³, respectivamente, que correspondieron a TGI de 69, 80 y 96% (Figuras 11A y 11B). Las TGI relacionadas con la dosis alcanzaron el umbral para actividad terapéutica potencial, pero solo los regímenes de 11 y 25 mg/kg fueron significativamente diferentes de los controles (Grupo 1 frente a 2, $P > 0,05$; Grupo 1 frente a 3, $P < 0,05$; Grupo 1 frente a 4, $P < 0,001$). No se registraron respuestas de regresión en los Grupos 2 y 3, mientras que el Grupo 4 produjo siete PR. El crecimiento tumoral de la mediana para los tres grupos se retrasó en comparación con el de los controles (Figura 11A).

Respuesta al tratamiento con el Compuesto 2 (Grupos 5-7): los Grupos 5-7 recibieron el Compuesto 2 a 5, 11 y 25 mg/kg, respectivamente, p.o. una vez al día x 21. El Día 22, los MTVs para los Grupos 5-7 fueron 320, 108 y 40 mm³, respectivamente, que correspondieron a TGI de 77, 92 y 97% (Figura 10(A-B)). Las TGI relacionadas con la dosis alcanzaron el umbral para actividad terapéutica potencial, pero solo los regímenes de 11 y 25 mg/kg fueron significativamente diferentes de los controles (Grupo 1 frente a 5, $P > 0,05$; Grupo 1 frente a 6, $P < 0,01$; Grupo 1 frente a 7, $P < 0,001$). No se registraron respuestas de regresión en el Grupo 5; sin embargo, el Grupo 6 produjo tres PR, y el Grupo 7 produjo ocho PR. El crecimiento tumoral de la mediana para los tres grupos se retrasó en comparación con el de los controles (Figura 10(A)).

Efectos secundarios: La Figura 11C muestra los cambios porcentuales del peso corporal medio (BW) desde el Día 1 para cada grupo. No se evaluaron muertes por TR en el estudio, y las pérdidas medias máximas de peso corporal estuvieron dentro de límites aceptables para todos los grupos.

Este estudio de xenoinjerto MV4-11 demuestra la utilidad de los compuestos de Fórmula I como posible terapia contra el cáncer. Las fuertes respuestas de regresión tumoral son particularmente impresionantes a la luz de la moderada pérdida de peso corporal observada y de las muertes no relacionadas con el tratamiento.

Ejemplo 9 - Estructuras cristalinas

PDK1 (restos 51-360) se expresó en *E. coli* como una proteína de fusión con GST, se purificó mediante cromatografía de afinidad de GSH, se escindió, se dializó, y se concentró. Se mezcló PDK1 51-360 con compuesto, y se generaron cocristales usando la metodología de difusión de vapor de gota colgante.

Las Figuras 12A a 12E ilustran las diferentes estructuras de PDK1-ligando observadas para un compuesto de la invención en contraste con ATP y los inhibidores de PDK1 GSK2334470 y BX-320. 12A): Estructura cristalina del Compuesto 3, un compuesto representativo de Fórmula I, unido a PDK1. El Compuesto 3 se une en el bolsillo de purina de ATP y penetra profundamente en el núcleo de la proteína, ocupando el bolsillo de unión para el Phe del bucle de DFG que se reorienta hacia la superficie de la proteína, apoyándose Phe contra el compuesto. 12B): Superposición de PDK1 unida a ATP (código PDB 1h1w) y Compuesto 3. En gran medida, las dos cadenas proteicas se superponen estrechamente, pero se observan perturbaciones significativas en el lóbulo N-terminal (superior) de la proteína. Las conformaciones clave que son exclusivas de ATP y Compuesto 3 se muestran en gris más claro y más oscuro, respectivamente. Se indican las dos ubicaciones diferentes de Phe/bucle de DFG. En la estructura unida al Compuesto 3, el resto de Phe reside en el área ocupada por los fosfatos de ATP en la estructura unida al ATP. Por el contrario, el resto de Phe apunta hacia el núcleo de la proteína en la estructura unida al ATP, un área que está ocupada por el Compuesto 3. De este modo, el ATP y el Compuesto 3 se unen a dos conformaciones mutuamente excluyentes de PDK1. También se observa que la unión del Compuesto 3 provoca una deformación de las hélices αB y αC de la proteína PDK1 con respecto a la estructura unida al ATP. 12C): Superposición de estructuras de PDK1 con Compuesto 3 y GSK2334470 (GSK, gris más claro). Las diferencias entre las estructuras unidas al Compuesto 3 y al GSK2334470 se localizan principalmente en el lóbulo N-terminal (superior). El Compuesto 3 ocupa un área que es exclusiva de los compuestos de la invención y no es accedida por GSK2334470. La ubicación de las hélices αB y αC es diferente en comparación con la estructura unida a GSK2334470, que se asemeja mucho a la estructura unida a ATP. 12D): Superposición de estructuras de PDK1 con el Compuesto 3 y BX-320 (gris más oscuro). El Compuesto 3 ocupa un área de PDK1 que es única para los compuestos de la invención, provocando un cambio conformacional en PDK1 que desplaza el bucle de DFG y las hélices αB y αC . Aunque el espacio ocupado por el compuesto BX-320 es en sí mismo visiblemente diferente de GSK2334470, las estructuras unidas a PDK1 con estos dos compuestos son sustancialmente idénticas y se parecen mucho a la estructura unida a ATP. 12E) Vista superior del dominio de cinasa N-terminal con el Compuesto 3, GSK2334470 y BX-320. Los tres compuestos ocupan el bolsillo que se une a la purina de ATP. De otro modo, los compuestos ocupan regiones diferentes, extendiéndose BX-320 (Figura 12E) y GSK2334470 a lo largo de la superficie de la proteína, llegando solamente los compuestos de Fórmula I al núcleo de la proteína, en el que los compuestos interrumpen las interacciones que mantienen las hélices αB y αC en su conformación nativa, como se define por la estructura unida a ATP. Esto es importante, ya que las hélices αB y αC desempeñan un papel en la unión al sustrato y en la estabilización de la conformación catalíticamente activa de la cinasa.

Ejemplo 10 - Ensayo de unión de fluorescencia de PIF-tida

Los ensayos de unión a péptidos se realizaron con las siguientes sondas: FITC-REPRILSEEEQEMFRDFDYADWC (SEQ ID NO.: 2), o FITC-EEQEMFRDFDYADW (SEQ ID NO.: 3) (síntesis personalizada). Se incubó PDK1 fosforilada de longitud completa con los péptidos marcados durante 1 h en Tris 10 mM (pH 7,5) que contenía MgCl₂ 10 mM,

0,01% de Triton X-100, y DTT 1 mM, en presencia de compuesto o de DMSO (concentración final 0,1%). La polarización de la fluorescencia se midió utilizando un lector de placas Tecan Infinite F500 con $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$.

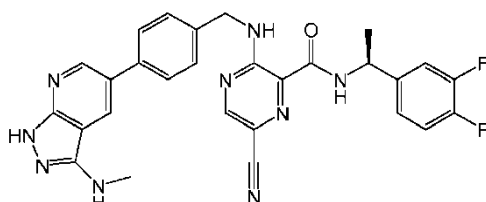
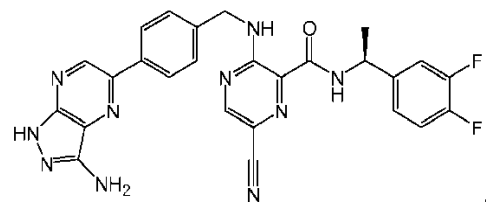
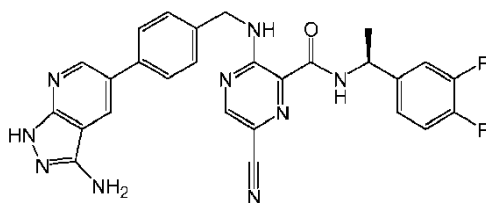
5 Se realizaron ensayos de unión a péptidos basados en FRET con FITC-REPRILSEEEQEMFRDFDYIADWC (SEQ ID NO.: 2). Se incubó PDK1 fosforilada de longitud completa con los péptidos marcados y anticuerpo anti-6His-criptato de Tb 0,4 nM (Cisbio Bioassays) durante 1 h en Tris 10 mM (pH 7,5) que contenía MgCl_2 10 mM, 0,01% de Triton X-100, 0,01% de caseína y DTT 1 mM, en presencia de compuesto o de DMSO (concentración final 0,1%).

10 La Figura 13A muestra una superposición de PDK1 unido al Compuesto 3 (gris medio) y los compuestos de comparación GSK2334470 (gris más claro) y BX-320 (gris más oscuro) con una vista del bolsillo de unión de PIF-tida (círculo negro) en la parte superior del lóbulo N-terminal de PDK1. Como se puede observar, el compuesto representativo de Fórmula I (gris medio) empuja hacia fuera las hélices αB y αC , y de ese modo perturba la estructura del bolsillo de unión de PIF. Para evaluar esto experimentalmente, se desarrolló un ensayo de unión para medir la unión de PIF-tida a PDK1. En este ensayo, un compuesto que se une al bolsillo de unión de ATP de PDK1 sin perturbar el bolsillo de PIF no mostrará ningún efecto de unión de PIF-tida como medido por polarización de fluorescencia, como se ilustra en la Figura 13B (mitad izquierda). Sin embargo, un compuesto que se une al bolsillo de unión de ATP de PDK1 y perturba el bolsillo de PIF mostrará una unión de PIF-tida reducida, medida por polarización de fluorescencia, como se ilustra en la Figura 13B (mitad derecha). Los resultados de estos estudios de unión, utilizando cantidades de compuesto saturantes de PDK1, se muestran en la Figura 13C: Como se esperaba, la Figura 13C) muestra que BX-795 (un inhibidor de PDK1 que se parece mucho y tiene el mismo modo de unión que BX-320) no muestra interferencia con la unión de PIF-tida, mientras que los tres compuestos de Fórmula I (Compuesto 3, Compuesto 1 y Compuesto 2) ensayados muestran una inhibición significativa de la unión de PIF-tida (la señal de fondo residual se atribuye a la unión no específica de PIF-tida). De este modo, los compuestos de Fórmula I pueden interferir con las interacciones con los sustratos dependientes de PIF, además de la inhibición de la actividad de cinasa. En la Figura 13D se muestran los datos para un segundo método de seguimiento del efecto de los compuestos sobre la unión de PIF-tida a PDK1. En este ensayo, se monitoriza la FRET entre un quelato de Tb unido a un anticuerpo que reconoce la etiqueta 6His en PDK1 y la PIF-tida marcada con FITC. El inhibidor de pan-cinasa estaurosporina, que no interrumpe el bolsillo de PIF-tida, no inhibe FRET entre PDK1 y PIF-tida, mientras que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 muestran una inhibición casi completa a una concentración de 10 nM de Compuesto. En la Figura 6 (C), el Compuesto 2 mostró un 90% de inhibición de P-RSK2 y un 40% de inhibición de P-PDK1 a las 4 h, mientras que GSK2334470 solo mostró una inhibición modesta del 20% de P-RSK2 a pesar de mostrar un 50% de inhibición de P-PDK1 (a las 24 h), lo que indica que la fosforilación de RSK2 es más sensible a la inhibición de PDK1 por el Compuesto 2 que por GSK-2334470. La perturbación del bolsillo de PIF, y de ese modo la unión al sustrato RSK2 mediada por PIF, podría explicar esta sensibilidad mejorada al Compuesto 2. Este es un aspecto único y novedoso de los compuestos de la invención que no se ha observado para los inhibidores catalíticos de PDK1, y puede ser de importancia crucial para la potencia celular mejorada de los compuestos de la invención y su utilidad como fármacos anticancerosos.

35

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

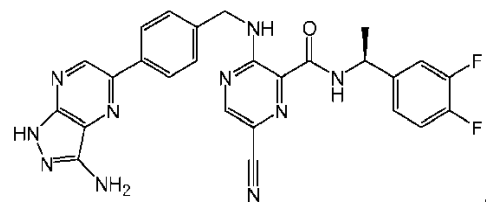
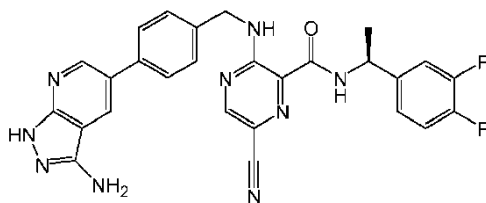


y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, para uso en un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesite, en el que el crecimiento o la supervivencia del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, comprendiendo el método administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

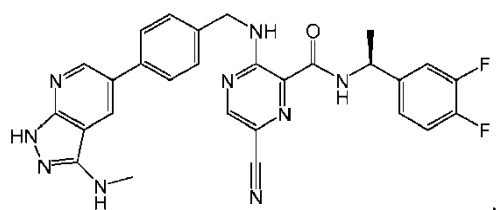
2. El compuesto para uso de la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer hematológico seleccionado del grupo que consiste en leucemias, linfomas y mielomas.

3. El compuesto para uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer hematológico se selecciona de linfoma anaplásico de células grandes, linfoma no de Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfoma de células B, linfoma de células T, linfoma de células del manto, linfoma histiocítico, leucemia de células T, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica aguda (linfoblástica), leucemia mielógena aguda, leucemia mieloblástica aguda, y leucemia de células plasmáticas.

4. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, en la que el crecimiento o la proliferación del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende una formulación que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



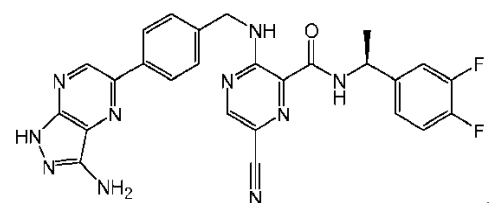
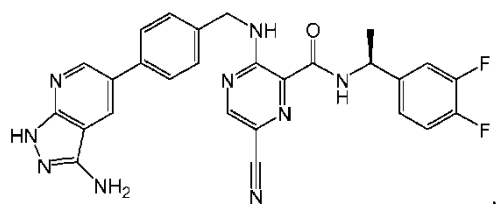
y



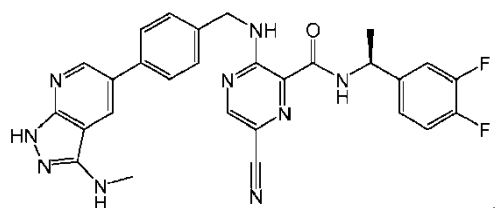
y sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición farmacéutica para uso en una terapia combinada para tratar cáncer en un sujeto, en la que el crecimiento o la proliferación del cáncer depende de una interacción con los sustratos mediada por PDK1-PIF, que comprende una formulación que incluye un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



y



10

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo; y

un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que la terapia combinada comprende además una cantidad eficaz de un segundo agente anticanceroso.

Figura 1A

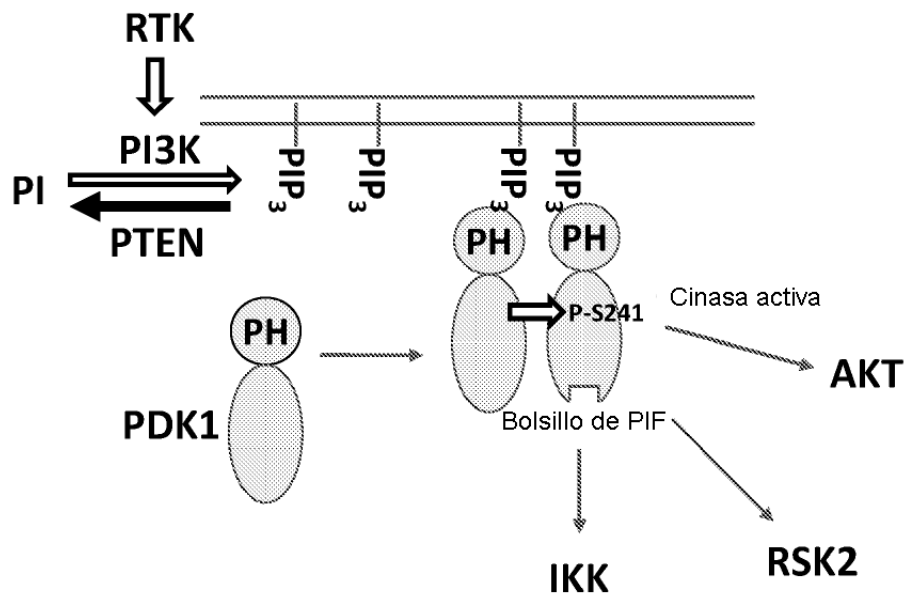


Figura 1B

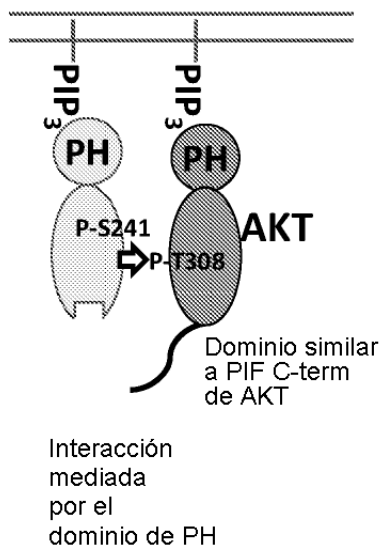


Figura 1C

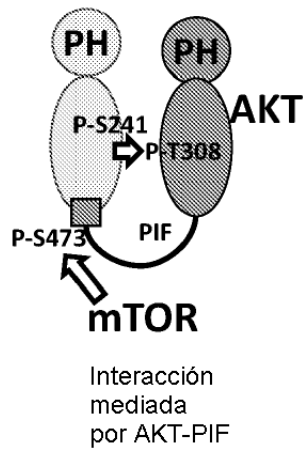
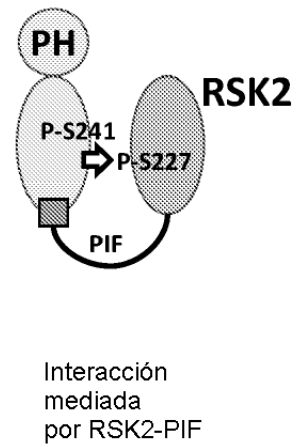


Figura 1D



○ PDK1 ● P-S241-PDK1

Figura 2A

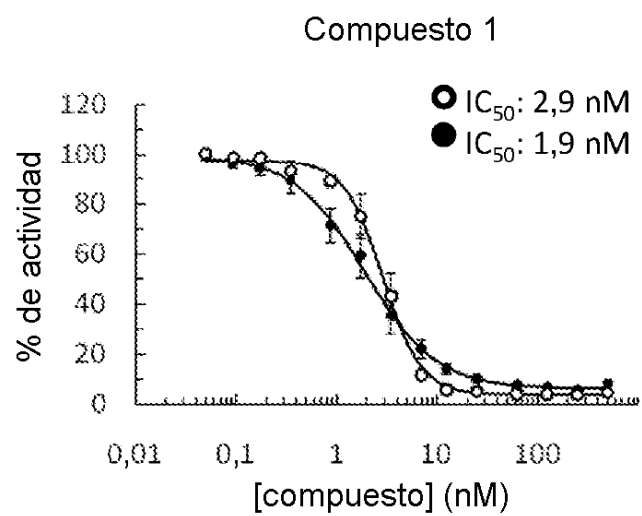
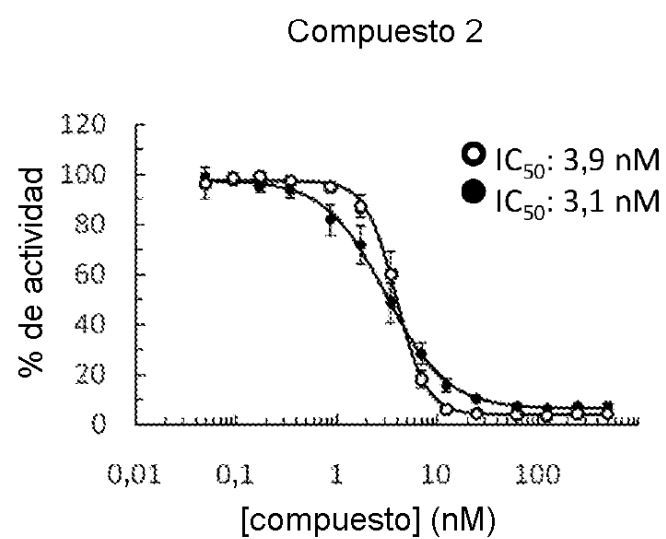


Figura 2B



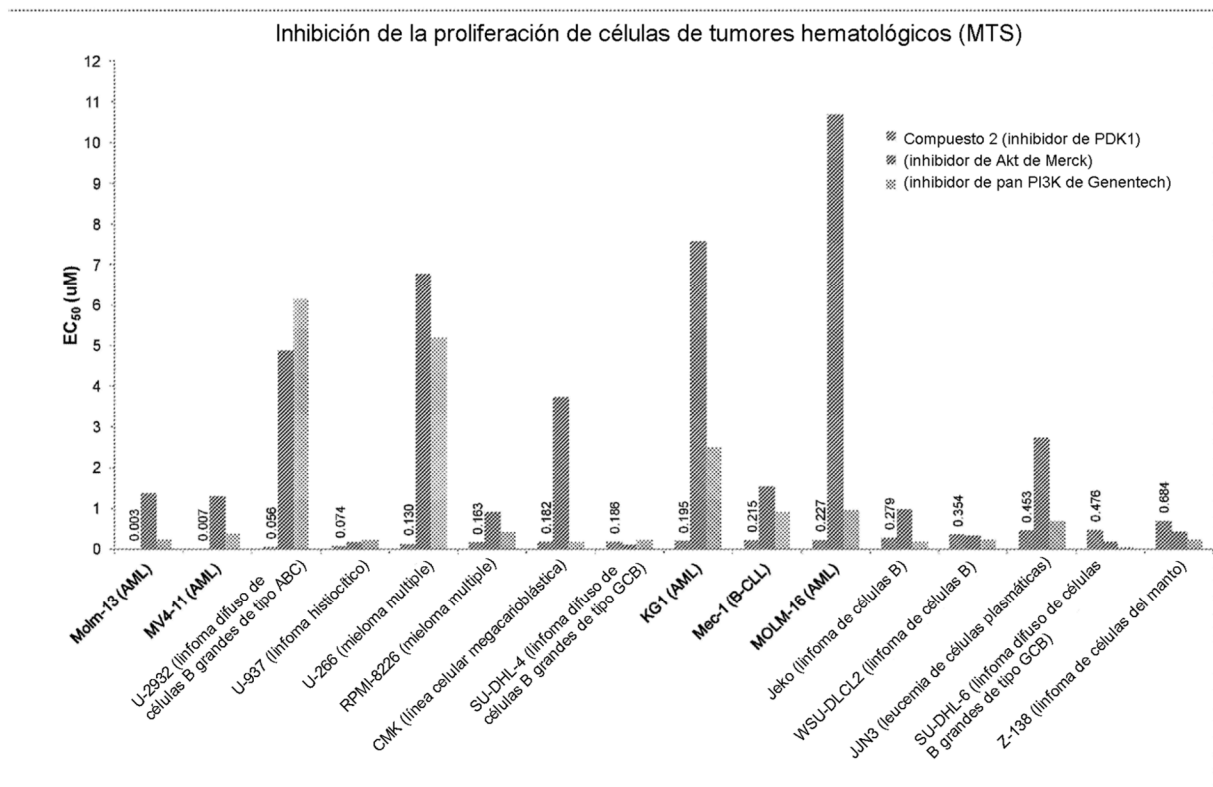


Figura 3

Figura 4A

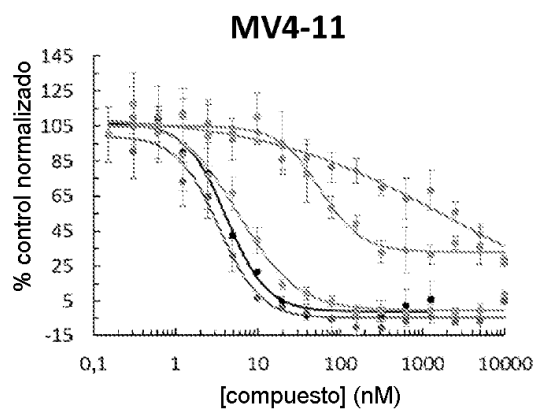


Figura 4B

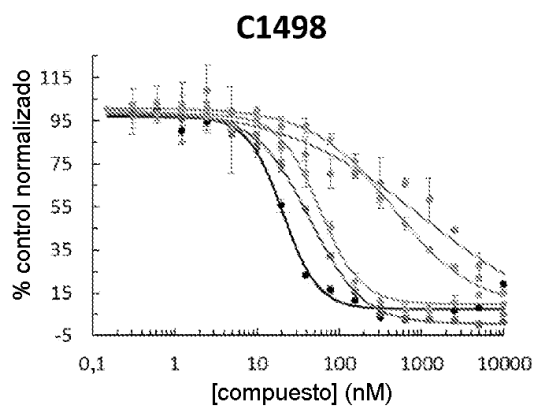


Figura 4C

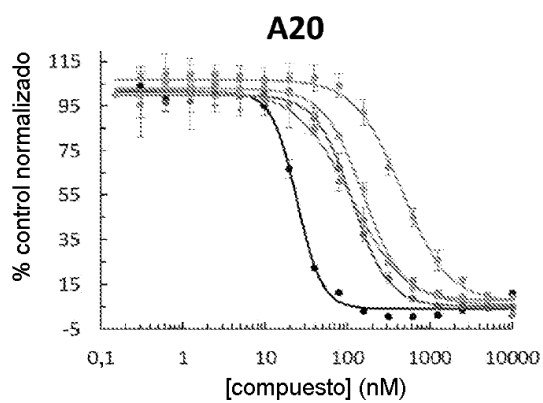


Figura 4D

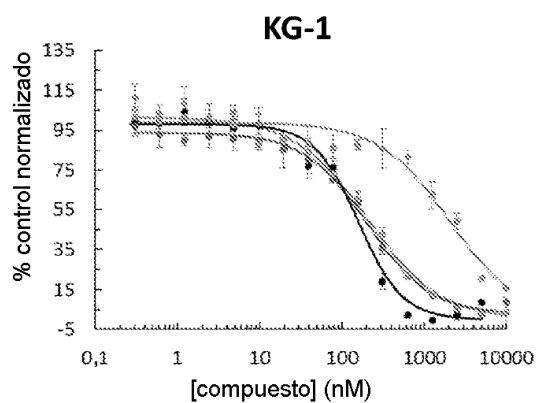


Figura 4E

IC ₅₀ (nM)	MV4-11	C1498	A20	KG-1
● Doxorubicina	4,0 ± 0,4	24 ± 2	23 ± 2	157 ± 1
○ GSK2334470	83 ± 29 meseta elevada	503 ± 61	547 ± 2	1724 ± 299
□ Compuesto 1	6,4 ± 0,2	58 ± 6	175 ± 1	146 ± 54
△ Compuesto 2	3,0 ± 0,1	50 ± 7		
	1500 ± 1193	1190 ± 140		

Figura 5A

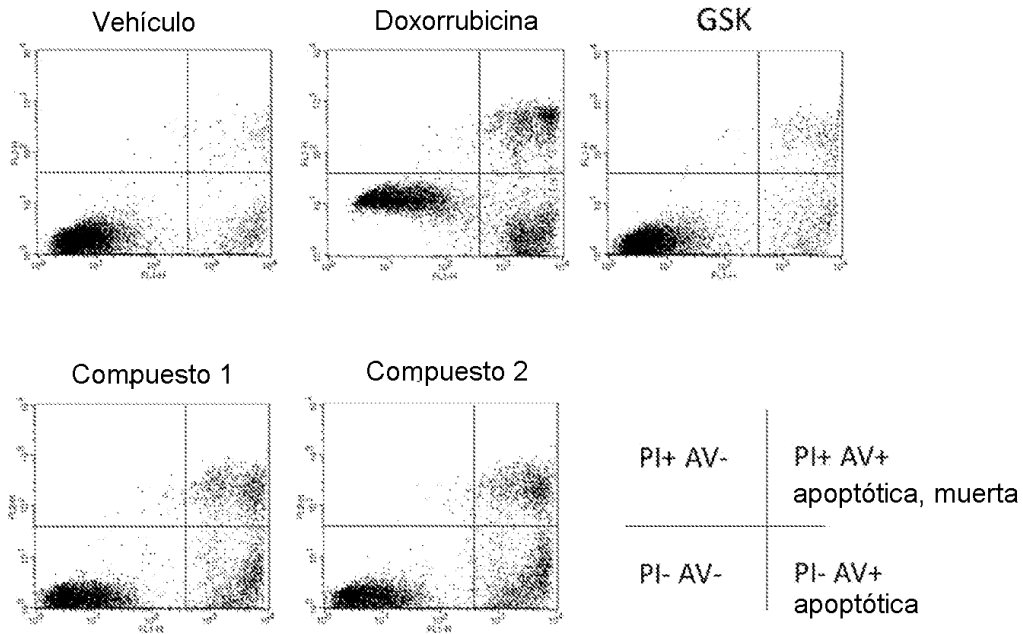


Figura 5B

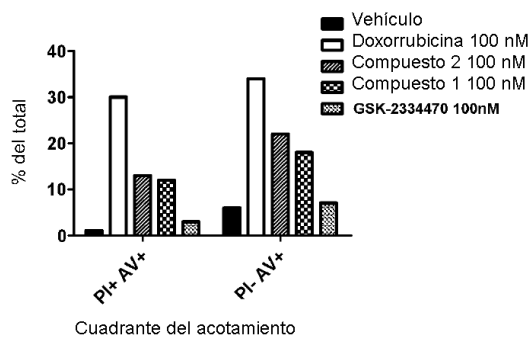


Figura 5C

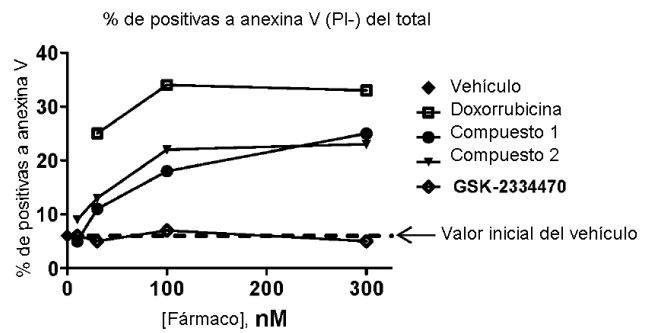


Figura 6A

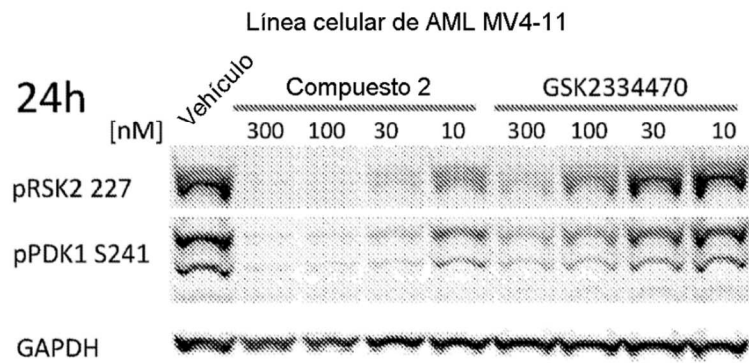


Figura 6B

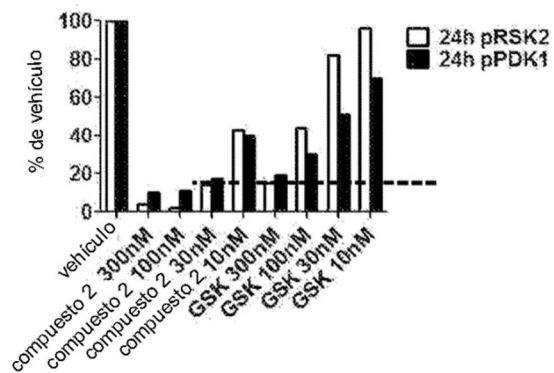


Figura 6C

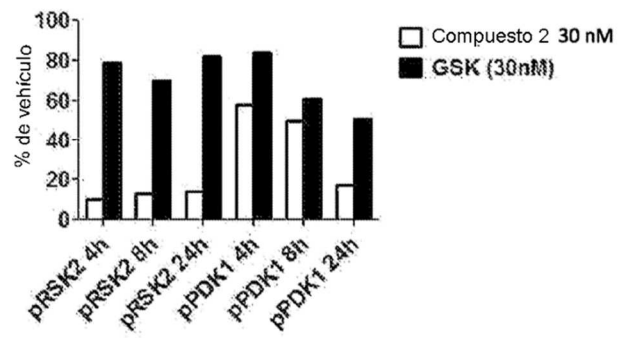


Figura 7A

Línea celular de linfoma de células B C1498

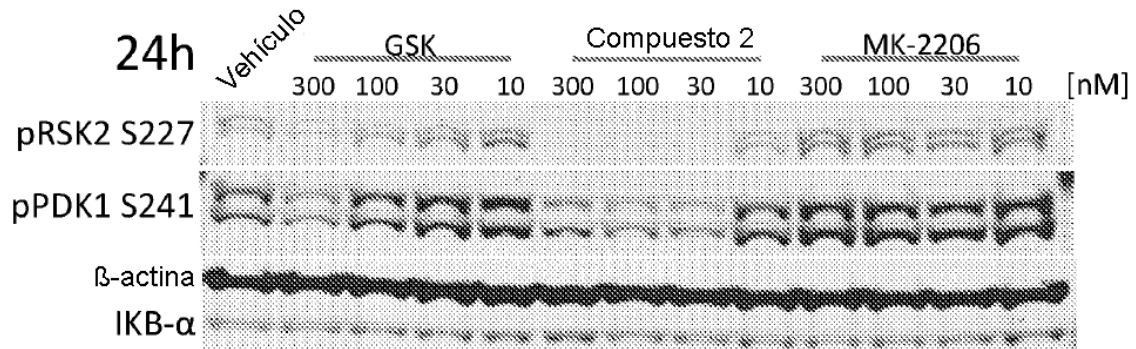


Figura 7B

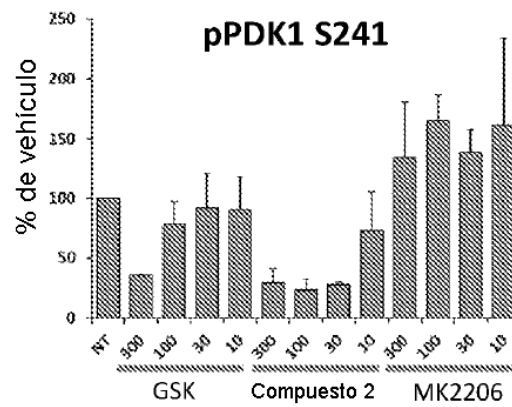
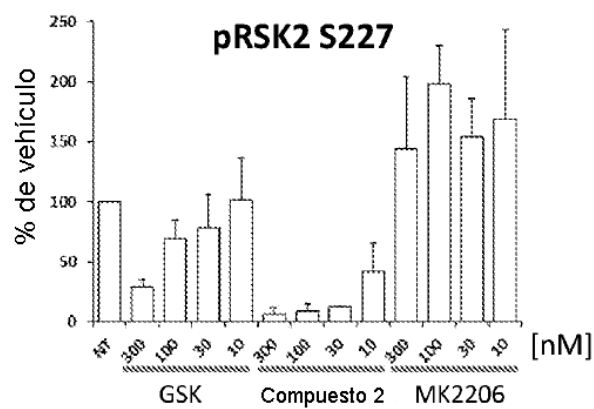


Figura 7C



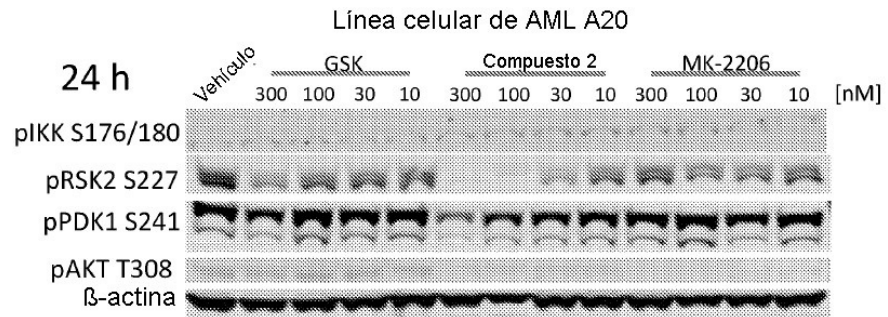


Figura 8A

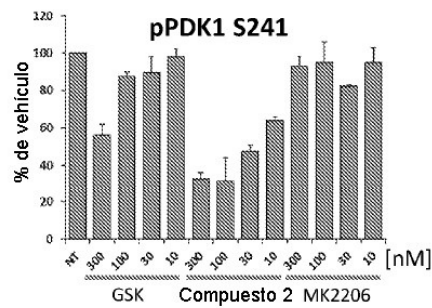


Figura 8B

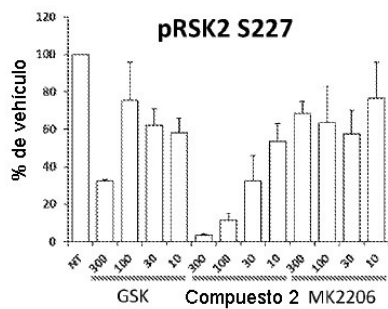


Figura 8C

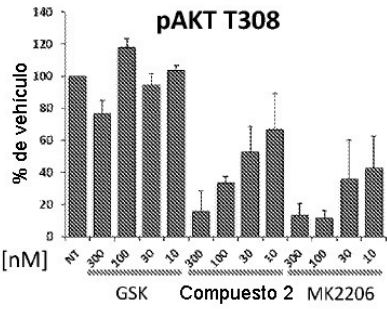


Figura 8D

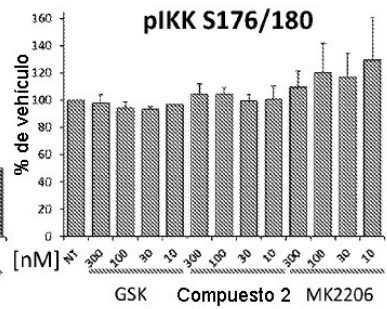


Figura 8E

Figura 9A

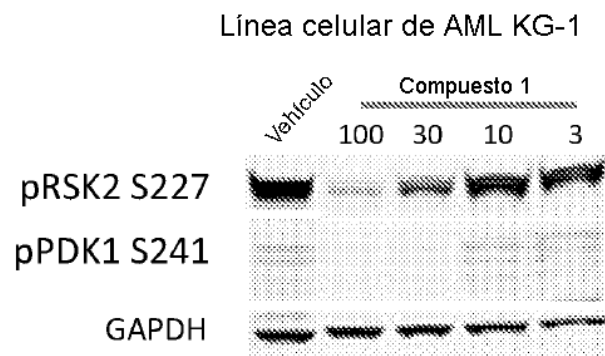


Figura 9B

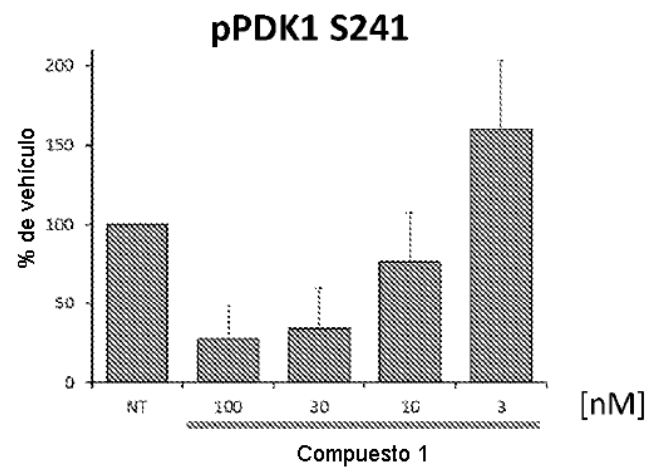
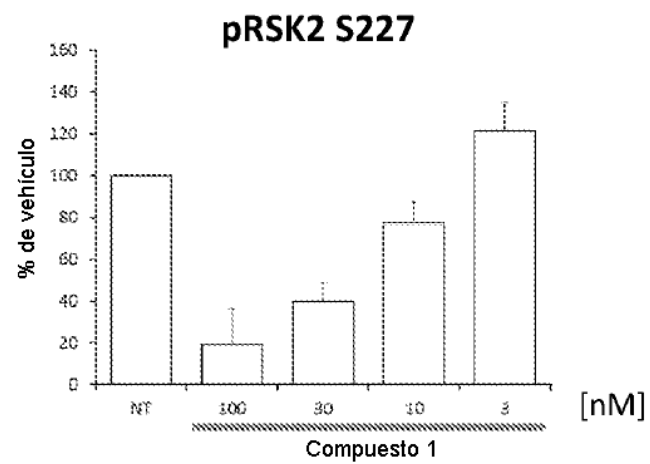


Figura 9C



Modulación de la ruta en tumores MV4-11

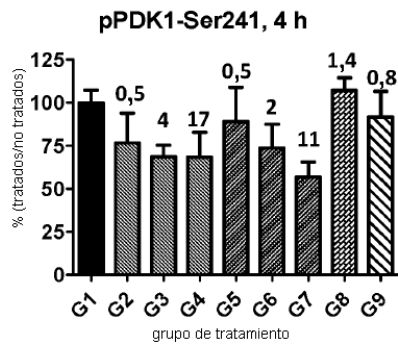


Figura 10A

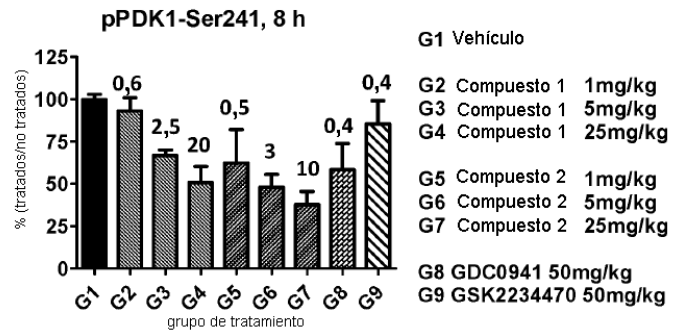


Figura 10B

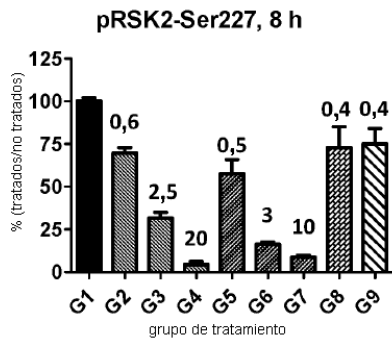


Figura 10C

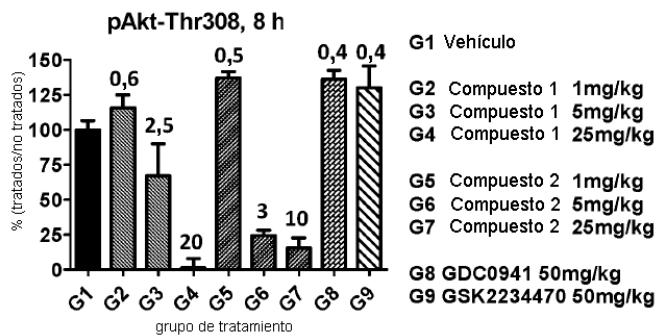


Figura 10D

Inhibición del crecimiento del tumor MV4-11 in vivo

Figura 11A

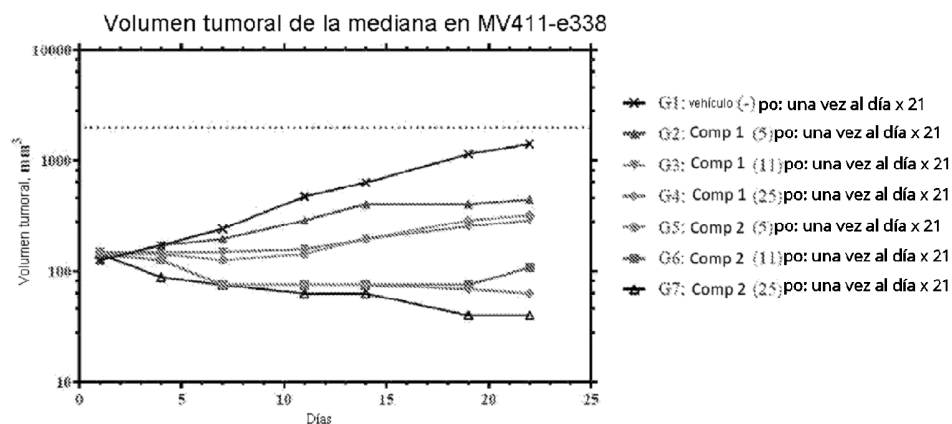
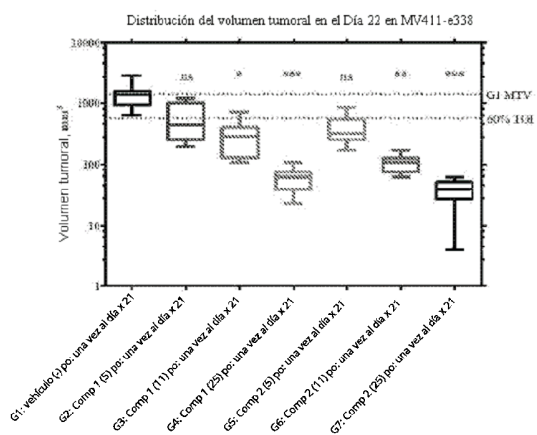


Figura 11B



Significancia estadística para el ensayo de Kruskal Wallis Dunn: ns = no significativo, * = $0,01 < P < 0,05$,

** = $0,001 < P < 0,01$, *** = $P < 0,001$ cuando se compara con el Grupo 1.

TGI > 60% indica actividad terapéutica potencial.

Figura 11C

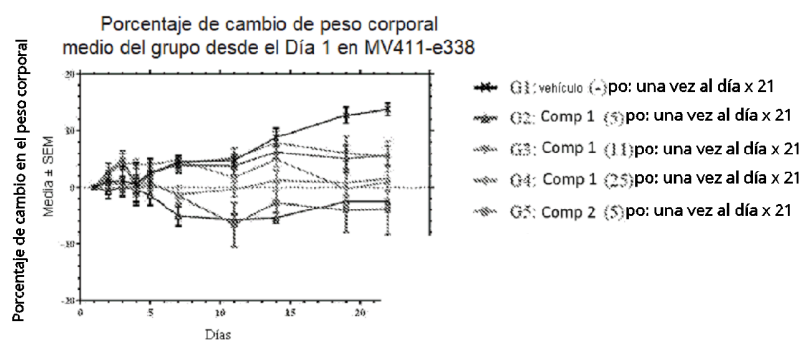


Figura 12A

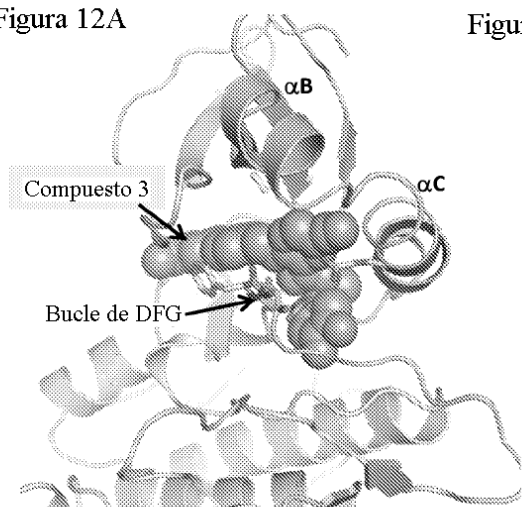


Figura 12B

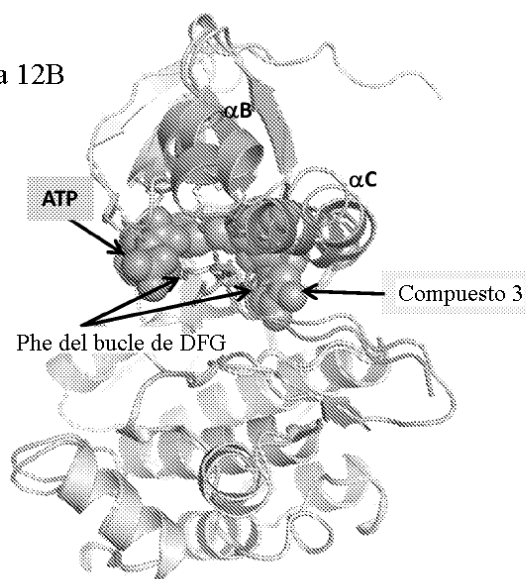


Figura 12C

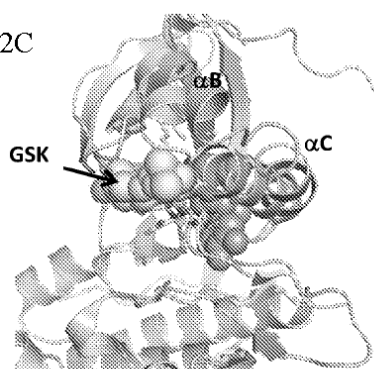


Figura 12D

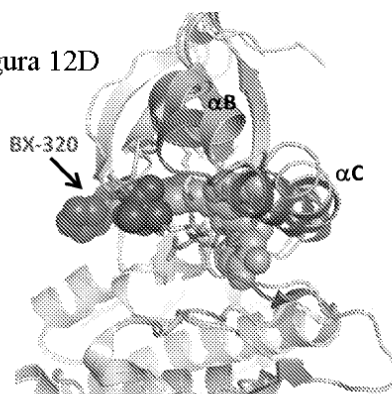


Figura 12E

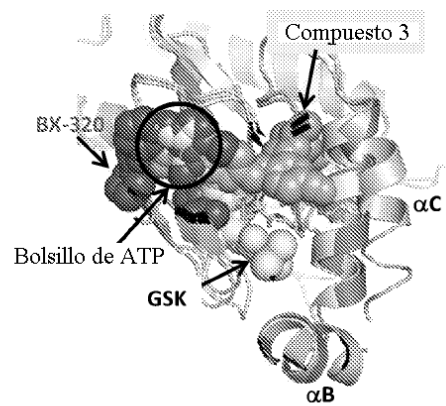


Figura 13A

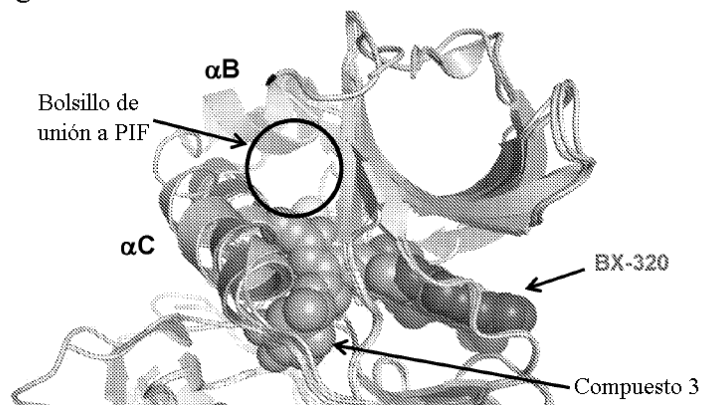
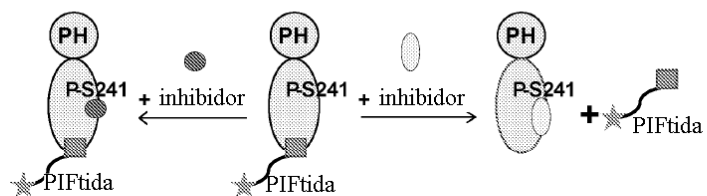


Figura 13B

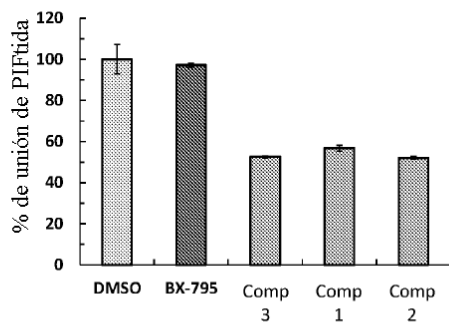
Ensayo de polarización de PIF-tida



Medida de PIF-tida unida/no unida en el ensayo de FP

Figura 13C

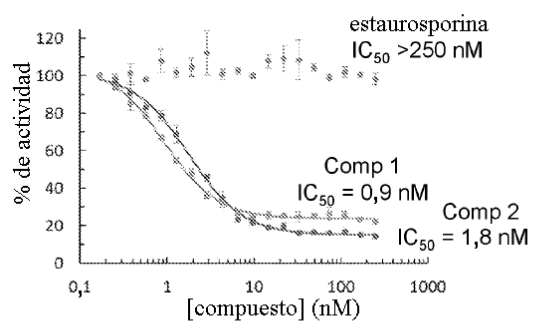
Ensayo de polarización de PIF-tida



Múltiple de 20 nM PDK incubación

Figura 13D

Ensayo de FRET de PIF-tida



0,5 nM P