



Agencia de
Digitalización USA Ltda



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

OL
D.F.
QF
BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

09-54952

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA AKT

SOLICITANTE: MERCK & CO., INC.

DIRECCIÓN: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907.

E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 28 de Mayo de 2009



No. 09-054952- -00000-0000

Fecha: 2009-05-28 16:20:20

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 140

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2009/000094

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: MERCK & CO., INC.Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: ESTADOS UNIDOSLugar de Constitución: ESTADOS UNIDOS

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: 1) Michael J. III KELLY, 2) Mark E. LAYTON 3) Phillip E. SANDERSONDirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 E.U.A.,Nacionalidad o Domicilio: 1 y 2) Estadounidenses 3) Británica

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/024772Fecha Diciembre 3, 2007Publicación Internacional No. WO 2008/070041Fecha Junio 12, 2008

6

Título (54) INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA AKT

7

Clasificación Internacional (51) C07D 401/14, C07D 401/06, C07D 403/04, C07D 403/06, C07D 407/04, C07D 409/04, C07D 413/04, C07D 417/04, C07D 471/04, A61K 31/4353, A61P 35/00

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

US

(32) Fecha

Diciembre 6, 2006

Enero 16, 2007

Septiembre 6, 2007

(31) Número de Solicitud

60/873.198

60/880,661

60/967,872

9

Comprobante de pago No. 09-38,786Fecha Mayo 27 de 2009

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 07-132.370

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:☐

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE
C.C. 79.782.747 Bta T.P. 74.295

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054952- -00000-0000

Fecha: 2009-05-28 16:20:20 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 38,786
FECHA : MAYO 27 DE 2009

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	105800015	27/05/2009	4,952,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

9

PODER ESPECIAL

Yo el abajo firmante, J. Ian Raisbeck, identificado con cédula de ciudadanía No. 79.376.996 de Bogotá, representante legal de OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA., sociedad limitada constituida en la República de Colombia, y obrando bajo las facultades otorgadas por el Poder General adjunto por la sociedad MERCK & Co. Inc., constituida de acuerdo a las leyes de New Jersey, Estados Unidos de América domiciliada en 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907, Estados Unidos de América, nombro por el presente a los Doctores CARLOS R. OLARTE y/o ANA MARIA FRIERI DEL CASTILLO y/o JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ y/o NATALIA CASTRO VELEZ, para que representen a la sociedad MERCK & Co. Inc., en la Republica de Colombia, en materia de patentes, y ante las autoridades ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses. Por el presente instrumento se revoca todo poder anteriormente otorgado por mi representada para realizar las gestiones antes mencionadas.

Dado y firmado el 28 de Mayo de 2007


J. IAN RAISBECK

DILIGENCIA DE PRESENTACIÓN PERSONAL Y
RECONOCIMIENTO DE LOS ESTADOS Y FIRMA.
NOTARIA EL ABOGADO RECONOCIDO DIFERENCIADO A:

27

FUE PRESENTADO PERSONALMENTE
ANTE M. EUGENIA ROJAS DE URUEYA
DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ

Con C.C. 79376996364613879905
Y APODOCAVIA DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ
DOCUMENTOS DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ
AUTORIZADO POR LA CIUDAD DE BOGOTÁ

EL ABOGADO:
[Signature]
HUBO: 27 MAY 2011 HUELLA

MARIA EUGENIA ROJAS DE URUEYA
NOTARIA VEINTISIETE
REPUBLICA DE COLOMBIA

REPUBLICA DE COLOMBIA
MARIA EUGENIA ROJAS DE URUEYA
NOTARIA
HUBO 27 Bogotá DC

WK

4682389



ESCRITURA PUBLICA NUMERO - - - - -

TRESCIENTOS DOCE (312).- - - - -

En la ciudad de Bogotá, Distrito
Capital, República de Colombia, a los

Veintidos - - - (22) días del mes de

Marzo - - - - - de dos mil siete (2007),

ante mi, MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA -

- - - - - NOTARIA(O) VEINTISIETE (27) DEL
CIRCULO DE BOGOTA, - - - se otorgó la escritura pública que se
consigna en los siguientes términos: - - - - -

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION: - - - - -

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.- - - - -

NIT: 830122870-6.- - - - -

Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA mayor edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la cédula de ciudadanía número 79.782.747, obrando en nombre y representación OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA, con número de identificación tributaria (NIT) 830122870-6 entidad legalmente constituida mediante escritura pública número mil ciento diecinueve (1119) de la notaría treinta y nueve (39) de Bogotá del diez (10) de junio de dos mil tres (2003), como lo acredita con el certificado de constitución y gerencia expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá que presenta para su protocolización y declaró - - - - -

PRIMERO.- Que presenta para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cinco (5) folios autenticados, un poder con su traducción la cual es del siguiente tenor: - - - - -

PODER GENERAL - - - - -

NOTARIA VEINTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Urueta

El suscrito, MERCK & CO., INC, domiciliado en 126 EAST LINCOLN AVENUE, RAHWAY, NJ 07065-0907, USA,-----

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con Oficinas en el World Trade Center Torre A, Calle 100 No. 8A-37, piso 10, Bogotá D.C. nuestro representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia y la República del Ecuador, la Republica del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de Policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales, elevar y tramitar solicitudes, declaraciones, y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento allanarse a la pretensión, recibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.-----

Firma: Donna L. Margiotto, Senior Manager, "Patent-----



01



* 5 6 4 7 1 8 1 1 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

1 DE FEBRERO DE 2007

HORA 09:15:34

02C25020105804PCT0708

HOJA : 001

* * * * *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS.

LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA, CON FUNDAMENTO EN LAS MATRICULAS E INSCRIPCIONES DEL REGISTRO MERCANTIL,

CERTIFICA :

NOMBRE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

N.I.T. : 830122870-6 ADMINISTRACION: BOGOTA PERSONAS JURIDICAS, REGIMEN COMUN.

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA :

MATRICULA NO. 01284164

CERTIFICA :

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003 , INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD COMERCIAL DENOMINADA: OR LEGAL LTDA

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001328 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 4 DE JULIO DE 2003 , INSCRITA EL 9 DE JULIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00887749 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : OR LEGAL LTDA POR EL DE : OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA PERO PARA TODOS LOS EFECTOS PODRA OPERAR BAJO EL NOMBRE OLARTERAISBECK

CERTIFICA :

REFORMAS:

ESCRITURA	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	INSCRIPCION	FECHA
0001328	2003/07/04	00039	BOGOTA D.C.	00887749	2003/07/09

CERTIFICA :

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE JUNIO DE 2103 .

CERTIFICA :

OBJETO SOCIAL : LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO PRINCIPAL LA PRESTACION DE SERVICIOS DE ASESORIA EN EL AREA SOCIAL, TECNICA, COMERCIAL Y JURIDICA, DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, NACIONALES O EXTRANJERAS, PUBLICAS O PRIVADAS. EN DESARROLLO DE SU OBJETO SOCIAL PODRA : A. PRESTAR ASESORIA Y EJERCER LA REPRESENTACION JUDICIAL DE PERSONAS NATURALES O JURIDICAS ANTE LAS DIFERENTES JURISDICCIONES Y PARTICIPAR EN SU NOMBRE Y REPRESENTACION EN TRIBUNALES DE ARBITRAMENTO, AMIGABLE COMPOSICION, CONCILIACION Y MEDIACION. B. CONFORMAR Y PARTICIPAR EN CENTROS DE ARBITRAJE Y CONCILIACION. C. CELEBRAR Y EJECUTAR TODAS LAS OPERACIONES DE CAMBIO Y COMERCIO EXTERIOR QUE REQUIERA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA COMPAÑIA ; D. ADQUIRIR, ENAJENAR, GRAVAR, DAR O TOMAR EN ARRENDAMIENTO TODA CLASE DE BIENES, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ;

NOTARIA VENTISIETE
Maria Eugenia Rojas de Buena

E. INTERVENIR COMO DEUDORA O ACREEDORA EN TODA CLASE DE OPERACIONES DE CREDITO, DANDO O RECIBIENDO LAS GARANTIAS DEL CASO CUANDO HAYA LUGAR A ELLAS ; F. CELEBRAR CON ESTABLECIMIENTOS DE CREDITO NACIONALES O EXTRANJEROS Y CON COMPAÑIAS ASEGURADORAS TODAS LAS OPERACIONES QUE SE RELACIONEN CON LOS NEGOCIOS Y BIENES SOCIALES. G. ABRIR, OPERAR Y CERRAR CUALQUIER TIPO DE CUENTAS BANCARIAS ; H. GIRAR, ACEPTAR, ENDOSAR, ASEGURAR, COBRAR, RECHAZAR, PROTESTAR, AVALAR GARANTIZAR Y NEGOCIAR EN GENERAL TODA CLASE DE INSTRUMENTOS NEGOCIABLES Y CUALQUIER OTRA CLASE DE TITULOS DE CREDITO ; I. ORGANIZAR, PROMOVER, FORMAR Y FINANCIAR SOCIEDADES O EMPRESAS NACIONALES O EXTRANJERAS QUE TIENDAN A FACILITAR, ENSANCHAR, O COMPLEMENTAR LOS NEGOCIOS SOCIALES DENTRO Y FUERA DEL PAIS Y SUSCRIBIR ACCIONES O CUOTAS EN ELLAS, Y EJERCER TODOS LOS DERECHOS Y OBLIGACIONES ECONOMICOS Y CORPORATIVOS QUE SURJAN DE DICHA PARTICIPACION. J. CREAR CONSORCIOS Y UNIONES TEMPORALES. K. SERVIR DE COMISIONISTA O INTERMEDIARIO COMERCIAL A TITULO DE CORRETAJE O A CUALQUIER OTRO TITULO ; L. SER CORRESPONSAL Y TENER CORRESPONSALES INTERNACIONALES ; M. EFECTUAR AVALUOS COMERCIALES DE TODA CLASE DE BIENES. N. ADQUIRIR Y CONSTRUIR TODA CLASE DE INSTALACIONES INDUSTRIALES O COMERCIALES COMO FABRICAS, TALLERES, ALMACENES DE DISTRIBUCION O VENTA ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO, ETC. O. DISTRIBUIR O VENDER TODO TIPO DE PRODUCTOS Y ABRIR Y ADMINISTRAR, DIRECTA O INDIRECTAMENTE, LOS ESTABLECIMIENTOS DE COMERCIO QUE SEAN NECESARIOS PARA ELLO. P. ENAJENAR, ARRENDAR, GRAVAR Y ADMINISTRAR EN GENERAL LOS BIENES QUE COMPONEN EL PATRIMONIO SOCIAL. Q. APORTAR SUS BIENES, EN TODO O EN PARTE, A OTRA U OTRAS SOCIEDADES A QUE LE CONVENGA VINCULARSE PARA UN MEJOR DESARROLLO DE SUS NEGOCIOS. R. TRANSIGIR, DESISTIR O SOMETER A DECISIONES ARBITRALES LAS CUESTIONES EN QUE TENGA INTERES FRENTE A TERCEROS. ; S. SOLICITAR, CONSEGUIR LOS REGISTROS RESPECTIVOS ANTE LA AUTORIDAD COMPETENTE Y EXPLOTAR EL DERECHO SOBRE MARCAS, NOMBRES COMERCIALES O CUALQUIER SIGNO DISTINTIVO, DIBUJOS, INSIGNIAS, PATENTES Y CUALQUIER OTRO DERECHO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL O INTELECTUAL YA SEA A NOMBRE DE LA SOCIEDAD O DE UN TERCERO. T. HACER PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES RELACIONADAS CON EL OBJETO SOCIAL. U. CELEBRAR Y EJECUTAR CON SU PROPIO NOMBRE Y POR CUENTA DE TERCEROS O EN PARTICIPACION CON ELLOS, ACTOS O CONTRATOS Y OPERACIONES EN GENERAL, TODO ACTO O CONTRATO QUE SEA NECESARIO O CONVENIENTE PARA CUMPLIR O FACILITAR LOS ACTOS Y OPERACIONES PREVISTAS EN LOS ESTATUTOS Y QUE DE MANERA DIRECTA SE RELACIONEN CON EL OBJETO SOCIAL, TAL COMO QUEDA DETERMINADO.

CERTIFICA :

CAPITAL Y SOCIOS : \$ 120,000,000.00 DIVIDIDO EN 12,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$ 10,000.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIOS CAPITALISTA(S)

FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA

C.C. 00045483209

NO. CUOTAS: 4,000.00

VALOR:\$40,000,000.00

RAISBECK LLINAS JAMES IAN

C.C. 00079376996

NO. CUOTAS: 4,000.00

VALOR:\$40,000,000.00

OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

C.C. 00079782747

NO. CUOTAS: 4,000.00

VALOR:\$40,000,000.00

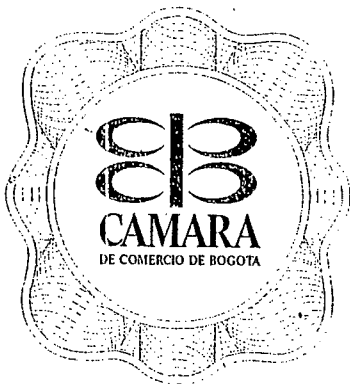
TOTALES

NO. CUOTAS: 12,000.00

VALOR :\$120,000,000.00

CERTIFICA :

REPRESENTACION LEGAL : LA SOCIEDAD TENDRA UN GERENTE GENERAL, EL CUAL TENDRA UN PRIMER SUPLENTE Y UN SEGUNDO SUPLENTE QUE LO



01



* 5 6 4 7 1 8 1 2 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE NORTE

1 DE FEBRERO DE 2007

HORA 09:15:35

02C25020105804PCT0708

HOJA : 002

* * * * *

REEMPLAZARA EN SUS FALTAS ABSOLUTAS, TEMPORALES O ACCIDENTALES, Y CUYA DESIGNACION Y REMOCION CORRESPONDERA TAMBIEN A LA JUNTA DE SOCIOS.

CERTIFICA :

** NOMBRAMIENTOS : **

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001119 DE NOTARIA 39 DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE JUNIO DE 2003 , INSCRITA EL 25 DE JUNIO DE 2003 BAJO EL NUMERO 00885810 DEL LIBRO IX , FUE(RON) NOMBRADO(S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

GERENTE

OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO

C.C.00079782747

PRIMER SUPLENTE DEL GERENTE

RAISBECK LLINAS JAMES IAN

C.C.00079376996

SEGUNDO SUPLENTE DEL GERENTE

FRIERI DEL CASTILLO ANA MARIA

C.C.00045483209

CERTIFICA :

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL : EL GERENTE GENERAL ES EL REPRESENTANTE LEGAL DE LA SOCIEDAD, Y EN CASO DE FALTA TEMPORAL O ABSOLUTA HARA SUS VECES EL PRIMER SUPLENTE O EN SU DEFECTO EL SEGUNDO SUPLENTE, TAMBIEN ELEGIDOS POR LA JUNTA DE SOCIOS. EL GERENTE REPRESENTARA Y COMPROMETERA A LA SOCIEDAD FRENTE A TERCEROS, SEAN PERSONAS O ENTIDADES PARTICULARES, OFICIALES O JUDICIALES. ASI MISMO, PODRA CELEBRAR EN SU NOMBRE CONTRATO DE ARRENDAMIENTO COMO ARRENDADOR O ARRENDATARIO. CONSTITUIR APODERADOS DE LA SOCIEDAD, DESISTIR, INTERPONER TODA CLASE DE RECURSOS RECIBIR DINERO EN MUTUO, HACER DEPOSITOS BANCARIOS O DE CUALQUIER OTRA INDOLE, FIRMAR TITULOS VALORES Y NEGOCIARLOS, TENERLOS, CONTRATARLOS, PAGARLOS, ENDOSARLOS, DESCARGARLOS, CELEBRAR CONTRATOS COMERCIALES, EJECUTAR LOS ACUERDOS DE LA JUNTA DE SOCIOS Y CONVOCARLA A REUNIONES ORDINARIAS O EXTRAORDINARIAS, SUSCRIBIR CONTRATOS LABORALES A NOMBRE DE LA SOCIEDAD, Y EN GENERAL TODAS LAS GESTIONES QUE OBEDEZCAN A LA NATURALEZA DE SU ENCARGO Y QUE SE RELACIONEN DIRECTAMENTE CON EL GIRO ORDINARIO DE LOS NEGOCIOS SOCIALES. EL GERENTE REQUERIRA APROBACION DE LA JUNTA DE SOCIOS PARA CELEBRAR ACTOS CUYA CUANTIA SEA O EXCEDA LA SUMA DE DIEZ MILLONES DE PESOS (\$10,000,000) MONEDA CORRIENTE.

CERTIFICA :

** REVISOR FISCAL: **

QUE POR ACTA NO. 0000006 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 5 DE MARZO DE 2004 , INSCRITA EL 8 DE JULIO DE 2004 BAJO EL NUMERO 00942232 DEL LIBRO IX , FUE(RON) NOMBRADO(S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

LACHE NUÑEZ JOSE LUCIO

C.C.00006763005

CERTIFICA :

DIRECCION DE NOTIFICACION JUDICIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C.

Maria Eugenia Rojas de Utrera

T-A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

DIRECCION COMERCIAL : CLL 100 NO 8A-37 P 10 W.T.C. T A

MUNICIPIO : BOGOTA D.C.

E-MAIL : ELIZABETH.BARBOSA@OLARTERAISBECK.COM

CERTIFICA :

QUE LA SOCIEDAD TIENE MATRICULADOS LOS SIGUIENTES ESTABLECIMIENTOS :

NOMBRE : OR LEGAL LIMITADA

MATRICULA NO. 01284255

RENOVACION DE LA MATRICULA : EL 27 DE MARZO DE 2006

ULTIMO AÑO RENOVADO : 2006

CERTIFICA :

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA VIA GUBERNATIVA.

INFORMACION COMPLEMENTARIA

LOS SIGUIENTES DATOS SOBRE RIT Y PLANEACION DISTRITAL SON INFORMATIVOS

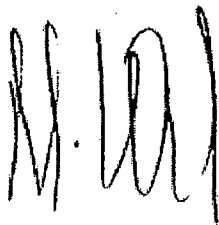
CONTRIBUYENTE INSCRITO EN EL REGISTRO RIT DE LA DIRECCION DISTRITAL DE IMPUESTOS, FECHA DE INSCRIPCION 2003/06/24

FECHA DE ENVIO DE INFORMACION A PLANEACION DISTRITAL: 10 DE JULIO DE 2004

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

VALOR : \$ 3,000.00

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES.



[Handwritten mark]

TRADUCCIÓN OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTÁ ORIGINALMENTE EN INGLÉS

El documento de Poder de Merck & Co., Inc. a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. lleva una certificación notarial con el siguiente sello en inglés:

(Firmado)

Sello: "Barbara Ann Cozzi, Notario Público de New Jersey - Mi comisión vence el 30 de Noviembre de 2008".

MINISTERIO DE REDES COMERCIALES
573217
COPIA FIRMADA POR EL NOTARIO DESEÑADA LAS FUNCIONES INDICADAS

Apostilla adjunta:

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País:	Estados Unidos de América
<u>El presente documento público</u>	
2. Ha sido firmado por:	Barbara Ann Cozzi
3. Actuando en calidad de:	Notario Público de New Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de:	Barbara Ann Cozzi, Notario
<u>Certificado</u>	
5. En:	Trenton, New Jersey
6. El:	6 de February de 2007
7. Por:	Bradley Abelow, Tesorero de New Jersey
8. Bajo el No.:	A282565
9. Sello / estampilla:	El Estado de New Jersey - Sello del Estado
10. Firma:	Bradley Abelow

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2007 MAR 1 A 8:49

JEFE DE REGALAZACIONES ENOTA D.C.

7131

Notario Publico de New Jersey

[Handwritten signature]
Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjus

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa del documento adjunto: "Merck & Co.Inc. - Apost."

Fecha: 15 de Febrero de 2007.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia.

Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.

E-mail: treseser1@yahoo.com. No. 9508



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

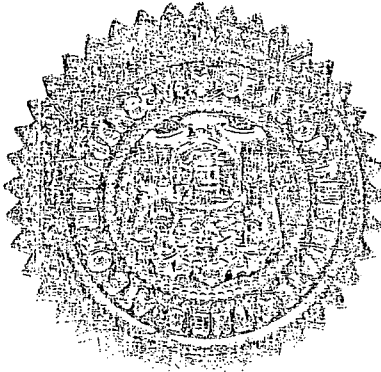
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA ANN COZZI
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA ANN COZZI, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 6TH DAY OF FEBRUARY 2007
7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A282565
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Bradley Abelow

OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI LTDA.

General Power

The undersigned,

domiciled in

126 EAST LINCOLN AVENUE, RAHWAY, NJ 07065-0907, USA.

hereby appoint Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. with offices in the World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., legal representatives with authority to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the authority to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

El suscrito,
MERCK & CO., INC.

domiciliado en

nombramos por el presente a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. con oficinas en el World Trade Center – Torre A, Calle 100 No. 8A-37, Piso 10, Bogotá D.C., nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma: X

Donna L. Margiotto

Donna L. Margiotto, Senior Manager, Patent Administration

Date/Fecha:

February 1,

2007

City, Country/Ciudad, País: Rahway, NJ, USA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
José Luis Londoño
Felipe Mendoza
Simón Salinas
Alexander Agudelo
Camilo A. Rodríguez

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

9

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date, February 1, 2007
The undersigned Notary Public certifies:

En esta fecha,
el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Donna L. Margiotto
of legal age and domiciled in
126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907, USA.
signed the foregoing document.

mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Senior Manager, Patent
Administration
of MERCK & CO., INC.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de

de

3. That MERCK & CO., INC.,
having its principal place of business located in
New Jersey, USA.

4. Que
con sede principal ubicada en

is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the General Power is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the
General Power and that his/her representation is
legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legitima.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

Corporate Resolution No. 5 – Patent
Matters, amended October 24, 2006 by the
Board of Directors of Merck & Co., Inc. at
a meeting held on October 24, 2006.

NOTARY PUBLIC (Signature): X

Barbara Ann Cozzi

BARBARA ANN COZZI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires Nov. 30, 2008

NOTARIA VERIFICADA
Maria Eugenia Rojas - Justa

WK 4682370



Aministration. -----

Fecha febrero 2007 -----

Ciudad País: Rahway, NJ, USA -----

CERTIFICACION NOTARIAL -----

En esta fecha, -----

El notario público suscrito certifica: -----

1. Que Donna L. Margiotto mayor de edad, y domiciliado 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065-0907, USA. Suscribió el documento que antecede. -----

2. Que el otorgamiento ha suscrito el referido documento en su carácter de de -----

4. Que -----

con sede principal ubicada en -----

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentran dentro de los que comprenden su objeto social. -----

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir poder, y que ésta es legítima. -----

5. El fundamento de mis certificaciones. contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s): -----

NOTARY PUBLIC (fdo. ilegible) BARBARA ANN COZZI Notary Public Of New Jersey My Comisión Expires Nov. 30, 2006 -----

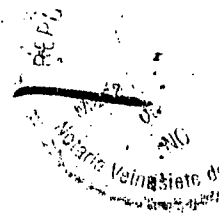
TRADUCCION OFICIAL DE UN DOCUMENTO QUE ESTA ORIGINALMENTE EN INGLES -----

El documento de Poder de Merck & Co., Inc. a Olarte Raisbeck & Frieri Ltda. lleva una certificación notarial con el siguiente sello en inglés:-----

(Firmado) -----

Sello: " Barbara Ann Cozzi, Notario Público de New Jersey- Mi comisión vence el 30 de Noviembre de 2008".-----

APOSTILLA



(Convention de La Haye Du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América -----

El presenté documento público -----

2. Ha sido firmado por: Barbara Ann Cozzi-----

3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey.-----

4 Lleva el sello/ estampilla de: Barbara Ann Cozzi, notario -----

Certificado

5. En: Trenton, New Jersey} -----

6) El 6 de February de 2007 -----

7. Por: Bradley Abelow, Tesorero de New Jesery. -----

8 Bajo el No. A282565 -----

9. Sello/ estampilla: El Estado de New Jesery- Sello del Estado--

10. Firma: Bradley Abelow -----

Certificación: -----

Certifico que la presente es una traducción verdadera y completa
del documento adjunto: "Merck & Co. Inc.- Apost"-----

Fecha: 15 de Febrero de 2007.-----

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes.- -----

Licencia No. 376 de 1993, del Ministerio de Justicia.- -----

Dirección Carrera 15 No. 99-13 Oficina 411. Bogotá, Colombia. ---

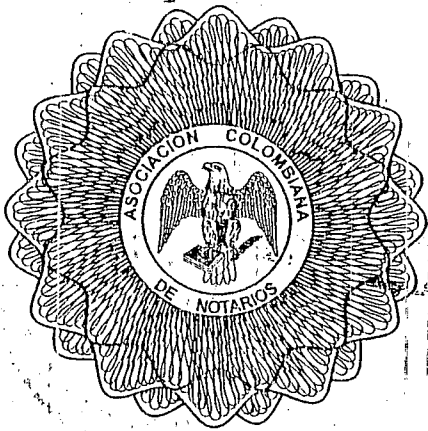
Teléfono: (57-1) 2182308, (57-1) 6232925.- -----

E-mail: treseser1@yahoo.com 9508- -----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de
dicho documentos al protocolo de ésta notaría para que de su
tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

El(los) compareciente(s) hace(n) constar que han verificado
cuidadosamente sus nombres completos, estado(s) civil(es), los
número(s) de sus documentos de identidad; Declara(n) que
todas las informaciones consignadas en el presente instrumento
son correctas y, en consecuencia, asumen la responsabilidad que

WK 4682371



se derive de cualquier inexactitud en los mismos. Conocen la ley y saben que el Notario responde de la regularidad formal de los instrumentos que autoriza, pero no de la veracidad de las declaraciones de los interesados.

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos previstos por la Ley. --- Se utilizaron las hojas de papel Notarial Nos: WK 4682369, WK 4682370, WK 4682371. ---

DERECHOS LEGALES: \$ 38.110.00 ✓

RESOLUCION 7880 DE 2006

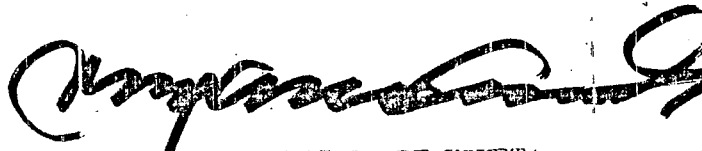
IVA \$ 14.642.00 ✓

CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

C.C.No. 79'782.747 Bogotá

TEL: 601-7700





MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) VENTISIETE (27) DE BOGOTÁ



redb.

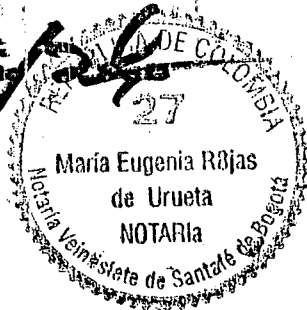
Es fiel y Segunda (2ª)
fotocopia de la Escritura Pública No. 312
de fecha 22 de Marzo de 2007
tomada de su original que expido en
Ocho (8) hojas útiles de papel
común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

Interesado

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a 29 MAR. 2007

El Notario Ventisiete de Santafé de Bogotá,





BLANCO EN BLANCO

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 June 2008 (12.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/070041 A2

(51) International Patent Classification: **Not classified**

(21) International Application Number:
PCT/US2007/024772

(22) International Filing Date:
3 December 2007 (03.12.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/873,198 6 December 2006 (06.12.2006) US
60/880,661 16 January 2007 (16.01.2007) US
60/967,872 6 September 2007 (06.09.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK & CO., INC.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **KELLY, Michael, J., III** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **LAYTON, Mark, E.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **SANDERSON, Philip, E.** [GB/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(74) Common Representative: **MERCK & CO., INC.**; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, ~~CO~~ CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, ~~FI~~ GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

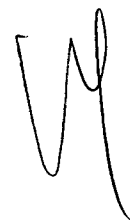
- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau



WO 2008/070041 A2

(54) Title: INHIBITORS OF AKT ACTIVITY

(57) Abstract: The instant invention provides for substituted naphthyridine compounds that inhibit Akt activity. In particular, the compounds disclosed selectively inhibit one or two of the Akt isoforms. The invention also provides for compositions comprising such inhibitory compounds and methods of inhibiting Akt activity by administering the compound to a patient in need of treatment of cancer.

TITLE OF THE INVENTION

INHIBITORS OF AKT ACTIVITY

BACKGROUND OF THE INVENTION

5 The present invention relates to substituted naphthyridine compounds which are inhibitors of the activity of one or more of the isoforms of the serine/threonine kinase, Akt (also known as PKB; hereinafter referred to as "Akt"). The present invention also relates to pharmaceutical compositions comprising such compounds and methods of using the instant compounds in the treatment of cancer.

10 Apoptosis (programmed cell death) plays essential roles in embryonic development and pathogenesis of various diseases, such as degenerative neuronal diseases, cardiovascular diseases and cancer. Recent work has led to the identification of various pro- and anti-apoptotic gene products that are involved in the regulation or execution of programmed cell death. Expression of anti-apoptotic genes, such as Bcl2 or Bcl-x_L, inhibits apoptotic cell death
15 induced by various stimuli. On the other hand, expression of pro-apoptotic genes, such as Bax or Bad, leads to programmed cell death (Adams et al. *Science*, 281:1322-1326 (1998)). The execution of programmed cell death is mediated by caspase-1 related proteinases, including caspase-3, caspase-7, caspase-8 and caspase-9 etc (Thornberry et al. *Science*, 281:1312-1316 (1998)).

20 The phosphatidylinositol 3'-OH kinase (PI3K)/Akt pathway appears important for regulating cell survival/cell death (Kulik et al. *Mol. Cell. Biol.* 17:1595-1606 (1997); Franke et al, *Cell*, 88:435-437 (1997); Kauffmann-Zeh et al. *Nature* 385:544-548 (1997) Hemmings *Science*, 275:628-630 (1997); Dudek et al., *Science*, 275:661-665 (1997)). Survival factors, such as platelet derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF) and insulin-like growth
25 factor-1 (IGF-1), promote cell survival under various conditions by inducing the activity of PI3K (Kulik et al. 1997, Hemmings 1997). Activated PI3K leads to the production of phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PtdIns(3,4,5)-P₃), which in turn binds to, and promotes the activation of, the serine/threonine kinase Akt, which contains a pleckstrin homology (PH)-domain (Franke et al *Cell*, 81:727-736 (1995); Hemmings *Science*, 277:534
30 (1997); Downward, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:262-267 (1998), Alessi et al., *EMBO J.* 15: 6541-6551 (1996)). Specific inhibitors of PI3K or dominant negative Akt mutants abolish survival-promoting activities of these growth factors or cytokines. It has been previously disclosed that inhibitors of PI3K (LY294002 or wortmannin) blocked the activation of Akt by upstream kinases. In addition, introduction of constitutively active PI3K or Akt mutants
35 promotes cell survival under conditions in which cells normally undergo apoptotic cell death (Kulik et al. 1997, Dudek et al. 1997).

 Three members of the Akt subfamily of second-messenger regulated serine/threonine protein kinases have been identified and termed Akt1/ PKB α , Akt2/PKB β , and

Akt3/PKBy (hereinafter referred to as "Akt1", "Akt2" and "Akt3"), respectively. The isoforms are homologous, particularly in regions encoding the catalytic domains. Akts are activated by phosphorylation events occurring in response to PI3K signaling. PI3K phosphorylates membrane inositol phospholipids, generating the second messengers phosphatidyl-inositol 3,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate, which have been shown to bind to the PH domain of Akt. The current model of Akt activation proposes recruitment of the enzyme to the membrane by 3'-phosphorylated phosphoinositides, where phosphorylation of the regulatory sites of Akt by the upstream kinases occurs (B.A. Hemmings, *Science* 275:628-630 (1997); B.A. Hemmings, *Science* 276:534 (1997); J. Downward, *Science* 279:673-674 (1998)).

Phosphorylation of Akt1 occurs on two regulatory sites, Thr³⁰⁸ in the catalytic domain activation loop and on Ser⁴⁷³ near the carboxy terminus (D. R. Alessi *et al. EMBO J.* 15:6541-6551 (1996) and R. Meier *et al. J. Biol. Chem.* 272:30491-30497 (1997)). Equivalent regulatory phosphorylation sites occur in Akt2 and Akt3. The upstream kinase, which phosphorylates Akt at the activation loop site has been cloned and termed 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1). PDK1 phosphorylates not only Akt, but also p70 ribosomal S6 kinase, p90RSK, serum and glucocorticoid-regulated kinase (SGK), and protein kinase C. The upstream kinase phosphorylating the regulatory site of Akt near the carboxy terminus has not been identified yet, but recent reports imply a role for the integrin-linked kinase (ILK-1), a serine/threonine protein kinase, or autophosphorylation.

Analysis of Akt levels in human tumors showed that Akt2 is overexpressed in a significant number of ovarian (J. Q. Cheng *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:9267-9271(1992)) and pancreatic cancers (J. Q. Cheng *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:3636-3641 (1996)). Similarly, Akt3 was found to be overexpressed in breast and prostate cancer cell lines (Nakatani *et al. J. Biol. Chem.* 274:21528-21532 (1999)).

The tumor suppressor PTEN, a protein and lipid phosphatase that specifically removes the 3' phosphate of PtdIns(3,4,5)-P₃, is a negative regulator of the PI3K/Akt pathway (Li *et al. Science* 275:1943-1947 (1997), Stambolic *et al. Cell* 95:29-39 (1998), Sun *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:6199-6204 (1999)). Germline mutations of PTEN are responsible for human cancer syndromes such as Cowden disease (Liaw *et al. Nature Genetics* 16:64-67 (1997)). PTEN is deleted in a large percentage of human tumors and tumor cell lines without functional PTEN show elevated levels of activated Akt (Li *et al. supra*, Guldberg *et al. Cancer Research* 57:3660-3663 (1997), Risinger *et al. Cancer Research* 57:4736-4738 (1997)).

These observations demonstrate that the PI3K/Akt pathway plays important roles for regulating cell survival or apoptosis in tumorigenesis.

Inhibition of Akt activation and activity can be achieved by inhibiting PI3K with inhibitors such as LY294002 and wortmannin. However, PI3K inhibition has the potential to indiscriminately affect not just all three Akt isozymes but also other PH domain-containing signaling molecules that are dependent on PtdIns(3,4,5)-P₃, such as the Tec family of tyrosine

kinases. Furthermore, it has been disclosed that Akt can be activated by growth signals that are independent of PI3K.

Alternatively, Akt activity can be inhibited by blocking the activity of the upstream kinase PDK1. No specific PDK1 inhibitors have been disclosed. Again, inhibition of PDK1 would result in inhibition of multiple protein kinases whose activities depend on PDK1, such as atypical PKC isoforms, SGK, and S6 kinases (Williams et al. *Curr. Biol.* 10:439-448 (2000)).

The compounds of the instant invention have unexpected advantageous properties over the cyclopropyl substituted naphthyridine compounds specifically described in WO 2006/135627.

It is an object of the instant invention to provide novel compounds that are inhibitors of Akt.

It is also an object of the present invention to provide pharmaceutical compositions that comprise the novel compounds that are inhibitors of Akt.

It is also an object of the present invention to provide a method for treating cancer that comprises administering such inhibitors of Akt activity.

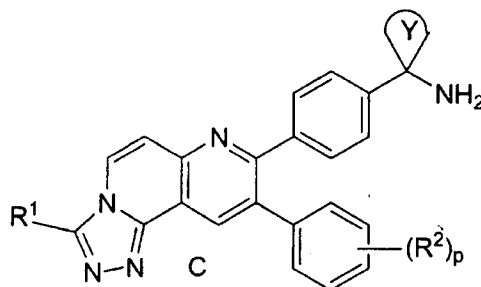
SUMMARY OF THE INVENTION

The instant invention provides for substituted naphthyridine compounds that inhibit Akt activity. In particular, the compounds disclosed selectively inhibit one or two of the Akt isoforms. The invention also provides for compositions comprising such inhibitory compounds and methods of inhibiting Akt activity by administering the compound to a patient in need of treatment of cancer.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The compounds of the instant invention are useful in the inhibition of the activity of the serine/threonine kinase Akt.

In an embodiment the inhibitors of the instant invention are illustrated by the Formula C:



wherein:

a is 0 or 1; b is 0 or 1; m is 0, 1 or 2; p is 0, 1 or 2;

R² is independently selected from: (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkoxy, CO₂H, halo, OH and NH₂;

Ring Y is (C₄-C₇)cycloalkyl;

5 R¹ is selected from: H, oxo, (C=O)_aOb(C₁-C₁₀)alkyl, (C=O)_aOb-aryl, (C=O)_aOb(C₂-C₁₀)alkenyl, (C=O)_aOb(C₂-C₁₀)alkynyl, CO₂H, halo, OH, Ob(C₁-C₆)perfluoroalkyl, (C=O)_aNR⁷R⁸, CN, (C=O)_aOb(C₃-C₈)cycloalkyl, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-(C₁-C₁₀)alkyl and (C=O)_aOb-heterocyclyl, said alkyl, aryl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, and heterocyclyl is optionally substituted with one or more substituents selected from R⁶;

10 R⁶ is: (C=O)_aObC₁-C₁₀ alkyl, (C=O)_aObaryl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, (C=O)_aOb heterocyclyl, CO₂H, halo, CN, OH, ObC₁-C₆ perfluoroalkyl, O_a(C=O)_bNR⁷R⁸, oxo, CHO, (N=O)R⁷R⁸, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-(C₁-C₁₀)alkyl or (C=O)_aObC₃-C₈ cycloalkyl, said alkyl, aryl, alkenyl, alkynyl, heterocyclyl, and cycloalkyl optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a};

15 R^{6a} is selected from: (C=O)_aOb(C₁-C₁₀)alkyl, O_a(C₁-C₃)perfluoroalkyl, (C₀-C₆)alkylene-S(O)_mR^a, SH, oxo, OH, halo, CN, (C₂-C₁₀)alkenyl, (C₂-C₁₀)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₀-C₆)alkylene-aryl, (C₀-C₆)alkylene-heterocyclyl, (C₀-C₆)alkylene-N(R^b)₂, C(O)R^a, (C₀-C₆)alkylene-CO₂R^a, C(O)H, and (C₀-C₆)alkylene-CO₂H, said alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, and heterocyclyl is optionally substituted with up to three substituents selected from R^b, OH, (C₁-C₆)alkoxy, halogen, CO₂H, CN, O_a(C=O)_b(C₁-C₆)alkyl, oxo, and N(R^b)₂;

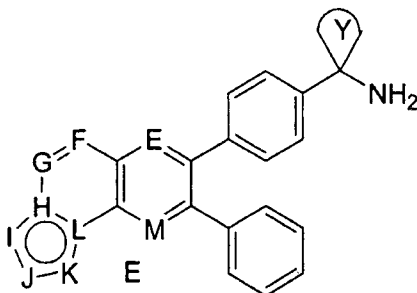
20 R⁷ and R⁸ are independently selected from: H, (C=O)_aOb(C₁-C₁₀)alkyl, (C=O)_aOb(C₃-C₈)cycloalkyl, (C=O)_aOb-aryl, (C=O)_aOb-heterocyclyl, (C₂-C₁₀)alkenyl, (C₂-C₁₀)alkynyl, SH, SO₂R^a, and (C=O)_aNR^b₂, said alkyl, cycloalkyl, aryl, heterocyclyl, alkenyl, and alkynyl is optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a}, or R⁷ and R⁸ can be taken together with the nitrogen to which they are attached to form a monocyclic or bicyclic heterocycle with 3-7 members in each ring and optionally containing, in addition to the nitrogen, one or two additional heteroatoms selected from N, O and S, said monocyclic or bicyclic heterocycle optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a};

30 R^a is (C₁-C₆)alkyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, aryl, or heterocyclyl; and

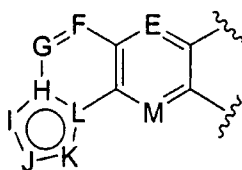
R^b is independently: H, (C₁-C₆)alkyl, aryl, heterocyclyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C=O)_aOb(C₁-C₆)alkyl, or S(O)_mR^a;

or a pharmaceutically acceptable salt or a stereoisomer thereof.

35 In another embodiment of this invention, the inhibitors of Akt activity are illustrated by the Formula E:

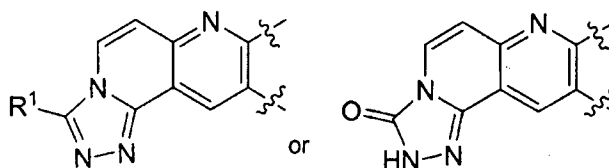


wherein:



5

is



Ring Y is cyclobutyl;

10 R^1 is H, pyrimidyl, methylimidazole, OH, methyl or cyclopropyl;
or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

A compound of the instant invention is:

1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutanamine dihydrochloride (**1-9**);

15 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

A compound of the instant invention is:

tert-butyl {1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-15**);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20 A compound of the instant invention is:

1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl] cyclobutanamine (**1-10**);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

A compound of the instant invention is:

8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-3(2*H*)-one (1-16);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5 A compound of the instant invention is:

1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl] cyclobutanamine (1-17);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

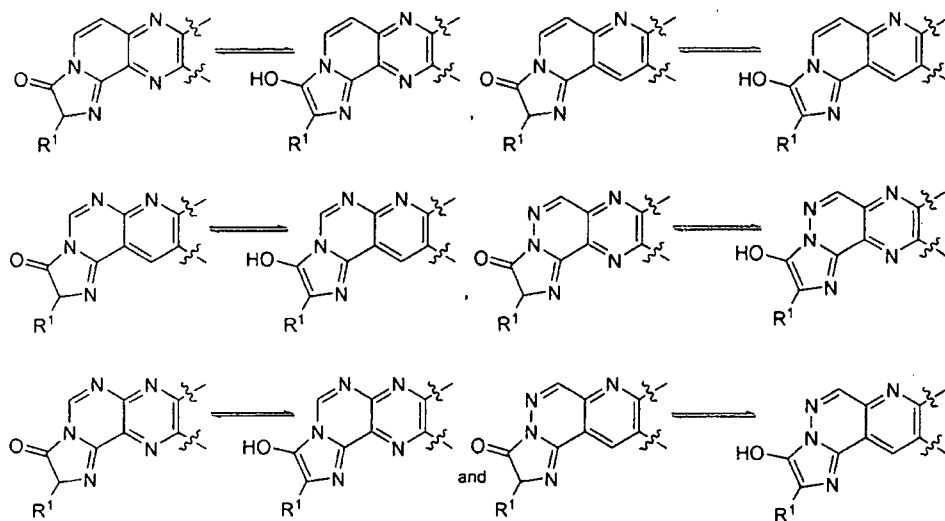
A compound of the instant invention is:

10 1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl] cyclobutanamine (1-23);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

The compounds of the present invention may have asymmetric centers, chiral axes, and chiral planes (as described in: E.L. Eliel and S.H. Wilen, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1994, pages 1119-1190), and occur as racemates, 15 racemic mixtures, and as individual diastereomers, with all possible isomers and mixtures thereof, including optical isomers, all such stereoisomers being included in the present invention.

In addition, the compounds disclosed herein may exist as tautomers and both tautomeric forms are intended to be encompassed by the scope of the invention, even though only 20 one tautomeric structure is depicted. For example:



Tetrazoles exist as a mixture of 1*H*/2*H* tautomers. The tautomeric forms of the tetrazol moiety are also within the scope of the instant invention.

This invention is also intended to encompass pro-drugs of the compounds 25 disclosed herein. A prodrug of any of the compounds can be made using well known pharmacological techniques.

When any variable (e.g. R², etc.) occurs more than one time in any constituent, its definition on each occurrence is independent at every other occurrence. Also, combinations of substituents and variables are permissible only if such combinations result in stable compounds. Lines drawn into the ring systems from substituents represent that the indicated bond may be attached to any of the substitutable ring atoms. If the ring system is bicyclic, it is intended that the bond be attached to any of the suitable atoms on either ring of the bicyclic moiety.

It is understood that one or more silicon (Si) atoms can be incorporated into the compounds of the instant invention in place of one or more carbon atoms by one of ordinary skill in the art to provide compounds that are chemically stable and that can be readily synthesized by techniques known in the art from readily available starting materials. Carbon and silicon differ in their covalent radius leading to differences in bond distance and the steric arrangement when comparing analogous C-element and Si-element bonds. These differences lead to subtle changes in the size and shape of silicon-containing compounds when compared to carbon. One of ordinary skill in the art would understand that size and shape differences can lead to subtle or dramatic changes in potency, solubility, lack of off target activity, packaging properties, and so on. (Diass, J. O. *et al.* *Organometallics* (2006) 5:1188-1198; Showell, G.A. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2006) 16:2555-2558).

It is understood that substituents and substitution patterns on the compounds of the instant invention can be selected by one of ordinary skill in the art to provide compounds that are chemically stable and that can be readily synthesized by techniques known in the art, as well as those methods set forth below, from readily available starting materials. If a substituent is itself substituted with more than one group, it is understood that these multiple groups may be on the same carbon or on different carbons, so long as a stable structure results. The phrase "optionally substituted with one or more substituents" should be taken to be equivalent to the phrase "optionally substituted with at least one substituent" and in such cases the preferred embodiment will have from zero to four substituents, and the more preferred embodiment will have from zero to three substituents.

As used herein, "alkyl" is intended to include both branched and straight-chain saturated aliphatic hydrocarbon groups having the specified number of carbon atoms. For example, C₁-C₁₀, as in "(C₁-C₁₀)alkyl" is defined to include groups having 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 carbons in a linear or branched arrangement. For example, "(C₁-C₁₀)alkyl" specifically includes methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *t*-butyl, *i*-butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, nonyl, decyl, and so on.

The term "cycloalkyl" means a monocyclic saturated aliphatic hydrocarbon group having the specified number of carbon atoms. For example, "cycloalkyl" includes cyclopropyl, methyl-cyclopropyl, 2,2-dimethyl-cyclobutyl, 2-ethyl-cyclopentyl, cyclohexyl, and so on.

"Alkoxy" represents either a cyclic or non-cyclic alkyl group of indicated number of carbon atoms attached through an oxygen bridge. "Alkoxy" therefore encompasses the definitions of alkyl and cycloalkyl above.

If no number of carbon atoms is specified, the term "alkenyl" refers to a non-aromatic hydrocarbon radical, straight, branched or cyclic, containing from 2 to 10 carbon atoms and at least one carbon to carbon double bond. Preferably one carbon to carbon double bond is present, and up to four non-aromatic carbon-carbon double bonds may be present. Thus, "(C₂-C₁₀)alkenyl" means an alkenyl radical having from 2 to 10 carbon atoms. Alkenyl groups include ethenyl, propenyl, butenyl, 2-methylbutenyl and cyclohexenyl. The straight, branched or cyclic portion of the alkenyl group may contain double bonds and may be substituted if a substituted alkenyl group is indicated.

The term "alkynyl" refers to a hydrocarbon radical straight, branched or cyclic, containing from 2 to 10 carbon atoms and at least one carbon to carbon triple bond. Up to three carbon-carbon triple bonds may be present. Thus, "(C₂-C₁₀)alkynyl" means an alkynyl radical having from 2 to 10 carbon atoms. Alkynyl groups include ethynyl, propynyl, butynyl, 3-methylbutynyl and so on. The straight, branched or cyclic portion of the alkynyl group may contain triple bonds and may be substituted if a substituted alkynyl group is indicated.

In certain instances, substituents may be defined with a range of carbons that includes zero, such as (C₀-C₆)alkylene-aryl. If aryl is taken to be phenyl, this definition would include phenyl itself as well as -CH₂Ph, -CH₂CH₂Ph, CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)Ph, and so on.

As used herein, "aryl" is intended to mean any stable monocyclic or bicyclic carbon ring of up to 7 atoms in each ring, wherein at least one ring is aromatic. Examples of such aryl elements include phenyl, naphthyl, tetrahydro-naphthyl, indanyl and biphenyl. In cases where the aryl substituent is bicyclic and one ring is non-aromatic, it is understood that attachment is via the aromatic ring.

The term heteroaryl, as used herein, represents a stable monocyclic or bicyclic ring of up to 7 atoms in each ring, wherein at least one ring is aromatic and contains from 1 to 4 heteroatoms selected from the group consisting of O, N and S. Heteroaryl groups within the scope of this definition include but are not limited to: acridinyl, carbazolyl, cinnolinyl, quinoxalinyl, pyrazolyl, indolyl, benzotriazolyl, furanyl, thienyl, benzothienyl, benzofuranyl, quinolinyl, isoquinolinyl, oxazolyl, isoxazolyl, indolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, pyridinyl, pyrimidinyl, pyrrolyl, tetrahydroquinoline. As with the definition of heterocycle below, "heteroaryl" is also understood to include the N-oxide derivative of any nitrogen-containing heteroaryl. In cases where the heteroaryl substituent is bicyclic and one ring is non-aromatic or contains no heteroatoms, it is understood that attachment is via the aromatic ring or via the heteroatom containing ring, respectively. Such heteroaryl moieties for substituent Q include but are not limited to: 2-benzimidazolyl, 2-quinolinyl, 3-quinolinyl, 4-quinolinyl, 1-isoquinolinyl, 3-isoquinolinyl and 4-isoquinolinyl.

The term "heterocycle" or "heterocyclyl" as used herein is intended to mean a 3- to 10-membered aromatic or nonaromatic heterocycle containing from 1 to 4 heteroatoms selected from the group consisting of O, N and S, and includes bicyclic groups. "Heterocyclyl" therefore includes the above mentioned heteroaryls, as well as dihydro and tetrathydro analogs thereof. Further examples of "heterocyclyl" include, but are not limited to the following:

benzoimidazolyl, benzoimidazolonyl, benzofuranyl, benzofurazanyl, benzopyrazolyl, benzotriazolyl, benzothiophenyl, benzoxazolyl, carbazolyl, carbolinyl, cinnolinyl, furanyl, imidazolyl, indolinyl, indolyl, indolaziny, indazolyl, isobenzofuranyl, isoindolyl, isoquinolyl, isothiazolyl, isoxazolyl, naphthpyridinyl, oxadiazolyl, oxazolyl, oxazoline, isoxazoline, oxetanyl, pyranyl, pyrazinyl, pyrazolyl, pyridazinyl, pyridopyridinyl, pyridazinyl, pyridyl, pyrimidyl, pyrrolyl, quinazolinyl, quinolyl, quinoxaliny, tetrahydropyranyl, tetrazolyl, tetrazolopyridyl, thiadiazolyl, thiazolyl, thienyl, triazolyl, azetidiny, 1,4-dioxanyl, hexahydroazepinyl, piperazinyl, piperidinyl, pyridin-2-onyl, pyrrolidinyl, morpholinyl, thiomorpholinyl, dihydrobenzoimidazolyl, dihydrobenzofuranyl, dihydrobenzothiophenyl, dihydrobenzoxazolyl, dihydrofuranyl, dihydroimidazolyl, dihydroindolyl, dihydroisooxazolyl, dihydroisothiazolyl, dihydrooxadiazolyl, dihydrooxazolyl, dihydropyrazinyl, dihydropyrazolyl, dihydropyridinyl, dihydropyrimidinyl, dihydropyrrolyl, dihydroquinoliny, dihydrotetrazolyl, dihydrothiadiazolyl, dihydrothiazolyl, dihydrothienyl, dihydrotriazolyl, dihydroazetidiny, methylenedioxybenzoyl, tetrahydrofuranyl, and tetrahydrothienyl, and N-oxides thereof. Attachment of a heterocyclyl substituent can occur via a carbon atom or via a heteroatom.

As appreciated by those of skill in the art, "halo" or "halogen" as used herein is intended to include chloro (Cl), fluoro (F), bromo (Br) and iodo (I).

In an embodiment, R^1 is selected from: oxo, NH_2 , OH, SH, $O_a(C_1-C_6)alkyl$, said alkyl is optionally substituted with R^{6a} .

In an embodiment R^b is independently selected from H and $(C_1-C_6)alkyl$.

In an embodiment of Formula C, R^1 is selected from: oxo, $(C=O)_aO_b(C_1-C_{10})alkyl$, $(C=O)_aO_b-aryl$, $(C=O)_aO_b(C_2-C_{10})alkenyl$, $(C=O)_aO_b(C_2-C_{10})alkynyl$, CO_2H , halo, OH, $O_b(C_1-C_6)perfluoroalkyl$, $(C=O)_aNR^7R^8$, CN, $(C=O)_aO_b(C_3-C_8)cycloalkyl$, $S(O)_2NR^7R^8$, SH, $S(O)_2-(C_1-C_{10})alkyl$ and $(C=O)_aO_b-heterocyclyl$, said alkyl, aryl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, and heterocyclyl is optionally substituted with R^{6a} .

In another embodiment of Formula C, R^1 is selected from: oxo, $(C=O)_aO_b(C_1-C_{10})alkyl$, CO_2H , halo, OH, CN, $(C_1-C_6)alkoxy$, $S(O)_2NR^7R^8$, SH, $S(O)_2-(C_1-C_{10})alkyl$, $O(C=O)(C_1-C_6)alkyl$ and $N(R^b)_2$, said alkyl is optionally substituted with R^{6a} .

In another embodiment of Formula C, R^1 is selected from: oxo, NH_2 , OH, SH, $O_a(C_1-C_6)alkyl$, said alkyl is optionally substituted with R^{6a} .

In another embodiment of Formula C, R^2 is selected from: oxo, $(C=O)_aO_b(C_1-C_{10})alkyl$, CO_2H , halo, OH, CN, $(C_1-C_6)alkoxy$, $O(C=O)(C_1-C_6)alkyl$, $(C_2-C_{10})alkenyl$ and

N(R^b)₂, said alkyl is optionally substituted with R^b, OH, (C₁-C₆)alkoxy, halogen, CO₂H, CN, O(C=O)(C₁-C₆)alkyl, oxo, and N(R^b)₂.

In another embodiment of Formula C, R¹ is selected from: H, heterocyclyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, OH, (C₁-C₆)alkyl, NH(C₁-C₆)alkyl, NH-heterocyclyl, NH-cycloalkyl, said heterocyclyl, cycloalkyl and alkyl is optionally substituted with: halo, (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkyl-NH₂, OH, O(C₁-C₆)alkyl and R² is selected from: H and halogen.

In another embodiment of Formula C, Ring Y is cyclobutyl; R¹ is selected from: H, heterocyclyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, OH, (C₁-C₆)alkyl, NH(C₁-C₆)alkyl, NH-heterocyclyl, NH-cycloalkyl, said heterocyclyl, cycloalkyl and alkyl is optionally substituted with: halo, (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkyl-NH₂, OH, O(C₁-C₆)alkyl and R² is H or F.

In another embodiment of Formula C, Ring Y is cyclobutyl; R¹ is: H or (C₁-C₆)alkyl; and R² is H or F.

Included in the instant invention is the free form of compounds of Formula C or E, as well as the pharmaceutically acceptable salts and stereoisomers thereof. Some of the isolated specific compounds exemplified herein are the protonated salts of amine compounds. The term "free form" refers to the amine compounds in non-salt form. The encompassed pharmaceutically acceptable salts not only include the isolated salts exemplified for the specific compounds described herein, but also all the typical pharmaceutically acceptable salts of the free form of compounds of Formula C or E. The free form of the specific salt compounds described may be isolated using techniques known in the art. For example, the free form may be regenerated by treating the salt with a suitable dilute aqueous base solution such as dilute aqueous NaOH, potassium carbonate, ammonia and sodium bicarbonate. The free forms may differ from their respective salt forms somewhat in certain physical properties, such as solubility in polar solvents, but the acid and base salts are otherwise pharmaceutically equivalent to their respective free forms for purposes of the invention.

The pharmaceutically acceptable salts of the instant compounds can be synthesized from the compounds of this invention which contain a basic or acidic moiety by conventional chemical methods. Generally, the salts of the basic compounds are prepared either by ion exchange chromatography or by reacting the free base with stoichiometric amounts or with an excess of the desired salt-forming inorganic or organic acid in a suitable solvent or various combinations of solvents. Similarly, the salts of the acidic compounds are formed by reactions with the appropriate inorganic or organic base.

Thus, pharmaceutically acceptable salts of the compounds of this invention include the conventional non-toxic salts of the compounds of this invention as formed by reacting a basic instant compound with an inorganic or organic acid. For example, conventional non-toxic salts include those derived from inorganic acids such as hydrochloric, hydrobromic, sulfuric, sulfamic, phosphoric, nitric and the like, as well as salts prepared from organic acids such as acetic, propionic, succinic, glycolic, stearic, lactic, malic, tartaric, citric, ascorbic,

pamoic, maleic, hydroxymaleic, phenylacetic, glutamic, benzoic, salicylic, sulfanilic, 2-acetoxybenzoic, fumaric, toluenesulfonic, methanesulfonic, ethane disulfonic, oxalic, isethionic, trifluoroacetic (TFA) and the like.

When the compound of the present invention is acidic, suitable "pharmaceutically acceptable salts" refers to salts prepared from pharmaceutically acceptable non-toxic bases including inorganic bases and organic bases. Salts derived from inorganic bases include aluminum, ammonium, calcium, copper, ferric, ferrous, lithium, magnesium, manganic salts, manganous, potassium, sodium, zinc and the like. Particularly preferred are the ammonium, calcium, magnesium, potassium and sodium salts. Salts derived from pharmaceutically acceptable organic non-toxic bases include salts of primary, secondary and tertiary amines, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines and basic ion exchange resins, such as arginine, betaine, caffeine, choline, N,N¹-dibenzylethylenediamine, diethylamine, 2-diethylaminoethanol, 2-dimethylaminoethanol, ethanolamine, ethylenediamine, N-ethylmorpholine, N-ethylpiperidine, glucamine, glucosamine, histidine, hydrabamine, isopropylamine, lysine, methylglucamine, morpholine, piperazine, piperidine, polyamine resins, procaine, purines, theobromine, triethylamine, trimethylamine, tripropylamine, tromethamine and the like.

The preparation of the pharmaceutically acceptable salts described above and other typical pharmaceutically acceptable salts is more fully described by Berg *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *J. Pharm. Sci.*, 1977:66:1-19.

It will also be noted that the compounds of the present invention are potentially internal salts or zwitterions, since under physiological conditions a deprotonated acidic moiety in the compound, such as a carboxyl group, may be anionic, and this electronic charge might then be balanced off internally against the cationic charge of a protonated or alkylated basic moiety, such as a quaternary nitrogen atom.

UTILITY

The compounds of the instant invention are inhibitors of the activity of Akt and are thus useful in the treatment of cancer, in particular cancers associated with irregularities in the activity of Akt and downstream cellular targets of Akt. Such cancers include, but are not limited to, ovarian, pancreatic, breast and prostate cancer, as well as cancers (including glioblastoma) where the tumor suppressor PTEN is mutated (Cheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89:9267-9271; Cheng *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996) 93:3636-3641; Bellacosa *et al.*, *Int. J. Cancer* (1995) 64:280-285; Nakatani *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1999) 274:21528-21532; Graff, *Expert. Opin. Ther. Targets* (2002) 6(1):103-113; and Yamada and Araki, *J. Cell Science.* (2001) 114:2375-2382; Mischel and Cloughesy, *Brain Pathol.* (2003) 13(1):52-61).

The compounds, compositions and methods provided herein are particularly deemed useful for the treatment of cancer. Cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include, but are not limited to: Cardiac: sarcoma



(angiosarcoma, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma), myxoma, rhabdomyoma, fibroma, lipoma and teratoma; Lung: non-small cell lung, bronchogenic carcinoma (squamous cell, undifferentiated small cell, undifferentiated large cell, adenocarcinoma), alveolar (bronchiolar) carcinoma, bronchial adenoma, sarcoma, lymphoma, chondromatous hamartoma, mesothelioma; Gastrointestinal: esophagus (squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, leiomyosarcoma, lymphoma), stomach (carcinoma, lymphoma, leiomyosarcoma), pancreas (ductal adenocarcinoma, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, carcinoid tumors, vipoma), small bowel (adenocarcinoma, lymphoma, carcinoid tumors, Kaposi's sarcoma, leiomyoma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), large bowel (adenocarcinoma, tubular adenoma, villous adenoma, hamartoma, leiomyoma), colon, colorectal, rectal; Genitourinary tract: kidney (adenocarcinoma, Wilm's tumor [nephroblastoma], lymphoma, leukemia), bladder and urethra (squamous cell carcinoma, transitional cell carcinoma, adenocarcinoma), prostate (adenocarcinoma, sarcoma), testis (seminoma, teratoma, embryonal carcinoma, teratocarcinoma, choriocarcinoma, sarcoma, interstitial cell carcinoma, fibroma, fibroadenoma, adenomatoid tumors, lipoma); Liver: hepatoma (hepatocellular carcinoma), cholangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, hepatocellular adenoma, hemangioma; Bone: osteogenic sarcoma (osteosarcoma), fibrosarcoma, malignant fibrous histiocytoma, chondrosarcoma, Ewing's sarcoma, malignant lymphoma (reticulum cell sarcoma), multiple myeloma, malignant giant cell tumor chordoma, osteochondroma (osteochondrogenous exostoses), benign chondroma, chondroblastoma, chondromyxofibroma, osteoid osteoma and giant cell tumors; Nervous system: skull (osteoma, hemangioma, granuloma, xanthoma, osteitis deformans), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), brain (astrocytoma, medulloblastoma, glioma, ependymoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiform, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, congenital tumors), spinal cord neurofibroma, meningioma, glioma, sarcoma); Gynecological: uterus (endometrial carcinoma); cervix (cervical carcinoma, pre-tumor cervical dysplasia), ovaries (ovarian carcinoma [serous cystadenocarcinoma, mucinous cystadenocarcinoma, unclassified carcinoma], granulosa-thecal cell tumors, Sertoli-Leydig cell tumors, dysgerminoma, malignant teratoma), vulva (squamous cell carcinoma, intraepithelial carcinoma, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (clear cell carcinoma, squamous cell carcinoma, botryoid sarcoma (embryonal rhabdomyosarcoma), fallopian tubes (carcinoma); Hematologic: blood (myeloid leukemia [acute and chronic], acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, myeloproliferative diseases, multiple myeloma, myelodysplastic syndrome), Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphoma [malignant lymphoma]; Skin: malignant melanoma, basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, Kaposi's sarcoma, moles, dysplastic nevi, lipoma, angioma, dermatofibroma, keloids, psoriasis; and Adrenal glands: neuroblastoma. Thus, the term "cancerous cell" as provided herein, includes a cell afflicted by any one of the above-identified conditions.

Cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include, but are not limited to: breast, prostate, colon, colorectal, lung, non-small cell lung, brain, testicular, stomach, pancreas, skin, small intestine, large intestine, throat, head and neck, oral, bone, liver, bladder, kidney, thyroid and blood.

5 Cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include: breast, prostate, colon, ovarian, colorectal, lung and non-small cell lung.

 Cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include: breast, colon, (colorectal) and lung (non-small cell lung).

10 Cancers that may be treated by the compounds, compositions and methods of the invention include: lymphoma and leukemia.

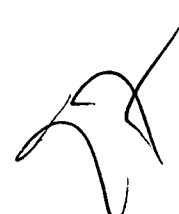
 The compounds of the instant invention are useful for the treatment of breast cancer.

 The compounds of the instant invention are useful for the treatment of prostate cancer.

15 Akt signaling regulates multiple critical steps in angiogenesis. Shiojima and Walsh, *Circ. Res.* (2002) 90:1243-1250. The utility of angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer is known in the literature, see J. Rak et al. *Cancer Research*, 55:4575-4580, 1995 and Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2(8):953-966, for example. The role of angiogenesis in cancer has been shown in numerous types of cancer and tissues: breast carcinoma (G. Gasparini and A.L. Harris, *J. Clin. Oncol.*, 1995, 13:765-782; M. Toi et al., *Japan. J. Cancer Res.*, 1994, 85:1045-1049); bladder carcinomas (A.J. Dickinson et al., *Br. J. Urol.*, 1994, 74:762-766); colon carcinomas (L.M. Ellis et al., *Surgery*, 1996, 120(5):871-878); and oral cavity tumors (J.K. Williams et al., *Am. J. Surg.*, 1994, 168:373-380). Other cancers include, advanced tumors, hairy cell leukemia, melanoma, advanced head and neck, metastatic renal cell, non-Hodgkin's lymphoma, metastatic breast, breast adenocarcinoma, advanced melanoma, pancreatic, gastric, glioblastoma, lung, ovarian, non-small cell lung, prostate, small cell lung, renal cell carcinoma, various solid tumors, multiple myeloma, metastatic prostate, malignant glioma, renal cancer, lymphoma, refractory metastatic disease, refractory multiple myeloma, cervical cancer, Kaposi's sarcoma, recurrent anaplastic glioma, and metastatic colon cancer (Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2(8):953-966). Thus, the Akt inhibitors disclosed in the instant application are also useful in the treatment of these angiogenesis related cancers.

25 Tumors which have undergone neovascularization show an increased potential for metastasis. In fact, angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis. (S.P. Cunningham, et al., *Can. Research*, 61: 3206-3211 (2001)). The Akt inhibitors disclosed in the present application are therefore also useful to prevent or decrease tumor cell metastasis.

30 Further included within the scope of the invention is a method of treating or preventing a disease in which angiogenesis is implicated, which is comprised of administering to a mammal in need of such treatment a therapeutically effective amount of a compound of the



present invention. Ocular neovascular diseases are an example of conditions where much of the resulting tissue damage can be attributed to aberrant infiltration of blood vessels in the eye (see WO 00/30651, published 2 June 2000). The undesirable infiltration can be triggered by ischemic retinopathy, such as that resulting from diabetic retinopathy, retinopathy of prematurity, retinal vein occlusions, etc., or by degenerative diseases, such as the choroidal neovascularization observed in age-related macular degeneration. Inhibiting the growth of blood vessels by administration of the present compounds would therefore prevent the infiltration of blood vessels and prevent or treat diseases where angiogenesis is implicated, such as ocular diseases like retinal vascularization, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, and the like.

Further included within the scope of the invention is a method of treating or preventing a non-malignant disease in which angiogenesis is implicated, including but not limited to: ocular diseases (such as, retinal vascularization, diabetic retinopathy and age-related macular degeneration), atherosclerosis, arthritis, psoriasis, obesity and Alzheimer's disease (Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2(8):953-966). In another embodiment, a method of treating or preventing a disease in which angiogenesis is implicated includes: ocular diseases (such as, retinal vascularization, diabetic retinopathy and age-related macular degeneration), atherosclerosis, arthritis and psoriasis.

Further included within the scope of the invention is a method of treating hyperproliferative disorders such as restenosis, inflammation, autoimmune diseases and allergy/asthma.

Further included within the scope of the instant invention is the use of the instant compounds to coat stents and therefore the use of the instant compounds on coated stents for the treatment and/or prevention of restenosis (WO03/032809).

Further included within the scope of the instant invention is the use of the instant compounds for the treatment and/or prevention of osteoarthritis (WO03/035048).

Further included within the scope of the invention is a method of treating hyperinsulinism.

The compounds of the invention are also useful in preparing a medicament that is useful in treating the diseases described above, in particular cancer.

In an embodiment of the invention, the instant compound is a selective inhibitor whose inhibitory efficacy is dependent on the PH domain. In this embodiment, the compound exhibits a decrease in *in vitro* inhibitory activity or no *in vitro* inhibitory activity against truncated Akt proteins lacking the PH domain.

In a further embodiment, the instant compound is selected from the group of a selective inhibitor of Akt1, a selective inhibitor of Akt2 and a selective inhibitor of both Akt1 and Akt2.

In another embodiment, the instant compound is selected from the group of a selective inhibitor of Akt1, a selective inhibitor of Akt2, a selective inhibitor of Akt3 and a selective inhibitor of two of the three Akt isoforms.

5 In another embodiment, the instant compound is a selective inhibitor of all three Akt isoforms, but is not an inhibitor of one, two or all of such Akt isoforms that have been modified to delete the PH domain, the hinge region or both the PH domain and the hinge region.

The present invention is further directed to a method of inhibiting Akt activity which comprises administering to a mammal in need thereof a pharmaceutically effective amount of the instant compound.

10 The compounds of this invention may be administered to mammals, including humans, either alone or, in combination with pharmaceutically acceptable carriers, excipients or diluents, in a pharmaceutical composition, according to standard pharmaceutical practice. The compounds can be administered orally or parenterally, including the intravenous, intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous, rectal and topical routes of administration.

15 The pharmaceutical compositions containing the active ingredient may be in a form suitable for oral use, for example, as tablets, troches, lozenges, aqueous or oily suspensions, dispersible powders or granules, emulsions, hard or soft capsules, or syrups or elixirs. Compositions intended for oral use may be prepared according to any method known to the art for the manufacture of pharmaceutical compositions and such compositions may contain one or
20 more agents selected from the group consisting of sweetening agents, flavoring agents, coloring agents and preserving agents in order to provide pharmaceutically elegant and palatable preparations. Tablets contain the active ingredient in admixture with non-toxic pharmaceutically acceptable excipients which are suitable for the manufacture of tablets. These excipients may be for example, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate, lactose, calcium
25 phosphate or sodium phosphate; granulating and disintegrating agents, for example, microcrystalline cellulose, sodium crosscarmellose, corn starch, or alginic acid; binding agents, for example starch, gelatin, polyvinyl-pyrrolidone or acacia, and lubricating agents, for example, magnesium stearate, stearic acid or talc. The tablets may be uncoated or they may be coated by known techniques to mask the unpleasant taste of the drug or delay disintegration and absorption
30 in the gastrointestinal tract and thereby provide a sustained action over a longer period. For example, a water soluble taste masking material such as hydroxypropylmethyl-cellulose or hydroxypropylcellulose, or a time delay material such as ethyl cellulose, cellulose acetate butyrate may be employed.

35 Formulations for oral use may also be presented as hard gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with an inert solid diluent, for example, calcium carbonate, calcium phosphate or kaolin, or as soft gelatin capsules wherein the active ingredient is mixed with water soluble carrier such as polyethyleneglycol or an oil medium, for example peanut oil, liquid paraffin, or olive oil.

Aqueous suspensions contain the active material in admixture with excipients suitable for the manufacture of aqueous suspensions. Such excipients are suspending agents, for example sodium carboxymethylcellulose, methylcellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, sodium alginate, polyvinyl-pyrrolidone, gum tragacanth and gum acacia; dispersing or wetting agents may be a naturally-occurring phosphatide, for example lecithin, or condensation products of an alkylene oxide with fatty acids, for example polyoxyethylene stearate, or condensation products of ethylene oxide with long chain aliphatic alcohols, for example heptadecaethylene-oxyctanol, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and a hexitol such as polyoxyethylene sorbitol monooleate, or condensation products of ethylene oxide with partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example polyethylene sorbitan monooleate. The aqueous suspensions may also contain one or more preservatives, for example ethyl, or n-propyl p-hydroxybenzoate, one or more coloring agents, one or more flavoring agents, and one or more sweetening agents, such as sucrose, saccharin or aspartame.

Oily suspensions may be formulated by suspending the active ingredient in a vegetable oil, for example arachis oil, olive oil, sesame oil or coconut oil, or in mineral oil such as liquid paraffin. The oily suspensions may contain a thickening agent, for example beeswax, hard paraffin or cetyl alcohol. Sweetening agents such as those set forth above, and flavoring agents may be added to provide a palatable oral preparation. These compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as butylated hydroxyanisol or alpha-tocopherol.

Dispersible powders and granules suitable for preparation of an aqueous suspension by the addition of water provide the active ingredient in admixture with a dispersing or wetting agent, suspending agent and one or more preservatives. Suitable dispersing or wetting agents and suspending agents are exemplified by those already mentioned above. Additional excipients, for example sweetening, flavoring and coloring agents, may also be present. These compositions may be preserved by the addition of an anti-oxidant such as ascorbic acid.

The pharmaceutical compositions of the invention may also be in the form of an oil-in-water emulsion. The oily phase may be a vegetable oil, for example olive oil or arachis oil, or a mineral oil, for example liquid paraffin or mixtures of these. Suitable emulsifying agents may be naturally-occurring phosphatides, for example soy bean lecithin, and esters or partial esters derived from fatty acids and hexitol anhydrides, for example sorbitan monooleate, and condensation products of the said partial esters with ethylene oxide, for example polyoxyethylene sorbitan monooleate. The emulsions may also contain sweetening, flavouring agents, preservatives and antioxidants.

Syrups and elixirs may be formulated with sweetening agents, for example glycerol, propylene glycol, sorbitol or sucrose. Such formulations may also contain a demulcent, a preservative, flavoring and coloring agents and antioxidant.

The pharmaceutical compositions may be in the form of sterile injectable aqueous solutions. Among the acceptable vehicles and solvents that may be employed are water, Ringer's solution and isotonic sodium chloride solution.

5 The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable oil-in-water microemulsion where the active ingredient is dissolved in the oily phase. For example, the active ingredient may be first dissolved in a mixture of soybean oil and lecithin. The oil solution then introduced into a water and glycerol mixture and processed to form a microemulsion.

10 The injectable solutions or microemulsions may be introduced into a patient's blood-stream by local bolus injection. Alternatively, it may be advantageous to administer the solution or microemulsion in such a way as to maintain a constant circulating concentration of the instant compound. In order to maintain such a constant concentration, a continuous intravenous delivery device may be utilized. An example of such a device is the Deltec CADD-PLUS™ model 5400 intravenous pump.

15 The pharmaceutical compositions may be in the form of a sterile injectable aqueous or oleagenous suspension for intramuscular and subcutaneous administration. This suspension may be formulated according to the known art using those suitable dispersing or wetting agents and suspending agents which have been mentioned above. The sterile injectable preparation may also be a sterile injectable solution or suspension in a non-toxic parenterally-acceptable diluent or solvent, for example as a solution in 1,3-butane diol. In addition, sterile, 20 fixed oils are conventionally employed as a solvent or suspending medium. For this purpose any bland fixed oil may be employed including synthetic mono- or diglycerides. In addition, fatty acids such as oleic acid find use in the preparation of injectables.

Compounds of Formula C or E may also be administered in the form of suppositories for rectal administration of the drug. These compositions can be prepared by 25 mixing the drug with a suitable non-irritating excipient which is solid at ordinary temperatures but liquid at the rectal temperature and will therefore melt in the rectum to release the drug. Such materials include cocoa butter, glycerinated gelatin, hydrogenated vegetable oils, mixtures of polyethylene glycols of various molecular weights and fatty acid esters of polyethylene glycol.

30 For topical use, creams, ointments, jellies, solutions or suspensions, etc., containing the compound of Formula C or E are employed. (For purposes of this application, topical application shall include mouth washes and gargles.)

The compounds for the present invention can be administered in intranasal form via topical use of suitable intranasal vehicles and delivery devices, or via transdermal routes, using those forms of transdermal skin patches well known to those of ordinary skill in the art. To 35 be administered in the form of a transdermal delivery system, the dosage administration will, of course, be continuous rather than intermittent throughout the dosage regimen. Compounds of the present invention may also be delivered as a suppository employing bases such as cocoa butter,



glycerinated gelatin, hydrogenated vegetable oils, mixtures of polyethylene glycols of various molecular weights and fatty acid esters of polyethylene glycol.

When a composition according to this invention is administered into a human subject, the daily dosage will normally be determined by the prescribing physician with the dosage generally varying according to the age, weight, and response of the individual patient, as well as the severity of the patient's symptoms.

The dosage regimen utilizing the compounds of the instant invention can be selected in accordance with a variety of factors including type, species, age, weight, sex and the type of cancer being treated; the severity (i.e., stage) of the cancer to be treated; the route of administration; the renal and hepatic function of the patient; and the particular compound or salt thereof employed. An ordinarily skilled physician or veterinarian can readily determine and prescribe the effective amount of the drug required to treat, for example, to prevent, inhibit (fully or partially) or arrest the progress of the disease. For example, compounds of the instant invention can be administered in a total daily dose of up to 10,000 mg. Compounds of the instant invention can be administered once daily (QD), or divided into multiple daily doses such as twice daily (BID), and three times daily (TID). Compounds of the instant invention can be administered at a total daily dosage of up to 10,000 mg, e.g., 2,000 mg, 3,000 mg, 4,000 mg, 6,000 mg, 8,000 mg or 10,000 mg, which can be administered in one daily dose or can be divided into multiple daily doses as described above.

For example, compounds of the instant invention can be administered in a total daily dose of up to 1,000 mg. Compounds of the instant invention can be administered once daily (QD), or divided into multiple daily doses such as twice daily (BID), and three times daily (TID). Compounds of the instant invention can be administered at a total daily dosage of up to 1,000 mg, e.g., 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg or 1,000 mg, which can be administered in one daily dose or can be divided into multiple daily doses as described above.

In addition, the administration can be continuous, i.e., every day, or intermittently. The terms "intermittent" or "intermittently" as used herein means stopping and starting at either regular or irregular intervals. For example, intermittent administration of a compound of the instant invention may be administration one to six days per week or it may mean administration in cycles (e.g. daily administration for two to eight consecutive weeks, then a rest period with no administration for up to one week) or it may mean administration on alternate days.

In addition, the compounds of the instant invention may be administered according to any of the schedules described above, consecutively for a few weeks, followed by a rest period. For example, the compounds of the instant invention may be administered according to any one of the schedules described above from two to eight weeks, followed by a rest period of one week, or twice daily at a dose of 100 - 500 mg for three to five days a week. In another particular embodiment, the compounds of the instant invention may be administered three times daily for two consecutive weeks, followed by one week of rest.

Any one or more of the specific dosages and dosage schedules of the compounds of the instant invention, may also be applicable to any one or more of the therapeutic agents to be used in the combination treatment (hereinafter referred to as the "second therapeutic agent").

Moreover, the specific dosage and dosage schedule of this second therapeutic agent can further vary, and the optimal dose, dosing schedule and route of administration will be determined based upon the specific second therapeutic agent that is being used.

Of course, the route of administration of the compounds of the instant invention is independent of the route of administration of the second therapeutic agent. In an embodiment, the administration for a compound of the instant invention is oral administration. In another embodiment, the administration for a compound of the instant invention is intravenous administration. Thus, in accordance with these embodiments, a compound of the instant invention is administered orally or intravenously, and the second therapeutic agent can be administered orally, parenterally, intraperitoneally, intravenously, intraarterially, transdermally, sublingually, intramuscularly, rectally, transbuccally, intranasally, liposomally, via inhalation, vaginally, intraocularly, via local delivery by catheter or stent, subcutaneously, intraadiposally, intraarticularly, intrathecally, or in a slow release dosage form.

In addition, a compound of the instant invention and second therapeutic agent may be administered by the same mode of administration, i.e. both agents administered e.g. orally, by IV. However, it is also within the scope of the present invention to administer a compound of the instant invention by one mode of administration, e.g. oral, and to administer the second therapeutic agent by another mode of administration, e.g. IV or any other ones of the administration modes described hereinabove.

The first treatment procedure, administration of a compound of the instant invention, can take place prior to the second treatment procedure, i.e., the second therapeutic agent, after the treatment with the second therapeutic agent, at the same time as the treatment with the second therapeutic agent, or a combination thereof. For example, a total treatment period can be decided for a compound of the instant invention. The second therapeutic agent can be administered prior to onset of treatment with a compound of the instant invention or following treatment with a compound of the instant invention. In addition, anti-cancer treatment can be administered during the period of administration of a compound of the instant invention but does not need to occur over the entire treatment period of a compound of the instant invention.

The instant compounds are also useful in combination with therapeutic, chemotherapeutic and anti-cancer agents. Combinations of the presently disclosed compounds with therapeutic, chemotherapeutic and anti-cancer agents are within the scope of the invention. Examples of such agents can be found in *Cancer Principles and Practice of Oncology* by V.T. Devita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. A person of ordinary skill in the art would be able to discern which combinations of agents would be useful based on the particular characteristics of the drugs and the cancer

involved. Such agents include the following: estrogen receptor modulators, androgen receptor modulators, retinoid receptor modulators, cytotoxic/cytostatic agents, antiproliferative agents, prenyl-protein transferase inhibitors, HMG-CoA reductase inhibitors and other angiogenesis inhibitors, HIV protease inhibitors, reverse transcriptase inhibitors, inhibitors of cell proliferation and survival signaling, bisphosphonates, aromatase inhibitors, siRNA therapeutics, γ -secretase inhibitors, agents that interfere with receptor tyrosine kinases (RTKs) and agents that interfere with cell cycle checkpoints. The instant compounds are particularly useful when co-administered with radiation therapy.

A compound of the instant invention may also be useful for treating cancer in combination with the following therapeutic agents: abarelix (Plenaxis depot®); aldesleukin (Prokine®); Aldesleukin (Proleukin®); Alemtuzumab (Campath®); alitretinoin (Panretin®); allopurinol (Zyloprim®); altretamine (Hexalen®); amifostine (Ethyol®); anastrozole (Arimidex®); arsenic trioxide (Trisenox®); asparaginase (Elspar®); azacitidine (Vidaza®); bevacuzimab (Avastin®); bexarotene capsules (Targretin®); bexarotene gel (Targretin®); bleomycin (Blenoxane®); bortezomib (Velcade®); busulfan intravenous (Busulfex®); busulfan oral (Myleran®); calusterone (Methosarb®); capecitabine (Xeloda®); carboplatin (Paraplatin®); carmustine (BCNU®, BiCNU®); carmustine (Gliadel®); carmustine with Polifeprosan 20 Implant (Gliadel Wafer®); celecoxib (Celebrex®); cetuximab (Erbix®); chlorambucil (Leukeran®); cisplatin (Platinol®); cladribine (Leustatin®, 2-CdA®); clofarabine (Clolar®); cyclophosphamide (Cytosan®, Neosar®); cyclophosphamide (Cytosan Injection®); cyclophosphamide (Cytosan Tablet®); cytarabine (Cytosar-U®); cytarabine liposomal (DepoCyt®); dacarbazine (DTIC-Dome®); dactinomycin, actinomycin D (Cosmegen®); Darbepoetin alfa (Aranesp®); daunorubicin liposomal (DanuoXome®); daunorubicin, daunomycin (Daunorubicin®); daunorubicin, daunomycin (Cerubidine®); Denileukin diftitox (Ontak®); dexrazoxane (Zinecard®); docetaxel (Taxotere®); doxorubicin (Adriamycin PFS®); doxorubicin (Adriamycin®, Rubex®); doxorubicin (Adriamycin PFS Injection®); doxorubicin liposomal (Doxil®); dromostanolone propionate (dromostanolone®); dromostanolone propionate (masterone injection®); Elliott's B Solution (Elliott's B Solution®); epirubicin (Ellence®); Epoetin alfa (epogen®); erlotinib (Tarceva®); estramustine (Emcyt®); etoposide phosphate (Etopophos®); etoposide, VP-16 (Vepesid®); exemestane (Aromasin®); Filgrastim (Neupogen®); floxuridine (intraarterial) (FUDR®); fludarabine (Fludara®); fluorouracil, 5-FU (Aducil®); fulvestrant (Faslodex®); gefitinib (Iressa®); gemcitabine (Gemzar®); gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®); goserelin acetate (Zoladex Implant®); goserelin acetate (Zoladex®); histrelin acetate (Histrelin implant®); hydroxyurea (Hydrea®); Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®); idarubicin (Idamycin®); ifosfamide (IFEX®); imatinib mesylate (Gleevec®); interferon alfa 2a (Roferon A®); Interferon alfa-2b (Intron A®); irinotecan (Camptosar®); lenalidomide (Revlimid®); letrozole (Femara®); leucovorin (Wellcovorin®, Leucovorin®); Leuprolide Acetate (Eligard®); levamisole (Ergamisol®); lomustine, CCNU (CeeBU®);

mecllorethamine, nitrogen mustard (Mustargen®); megestrol acetate (Megace®); melphalan, L-PAM (Alkeran®); mercaptopurine, 6-MP (Purinethol®); mesna (Mesnex®); mesna (Mesnex tabs®); methotrexate (Methotrexate®); methoxsalen (Uvadex®); mitomycin C (Mutamycin®); mitotane (Lysodren®); mitoxantrone (Novantrone®); nandrolone phenpropionate (Durabolin-50®); nelarabine (Arranon®); Nofetumomab (Verluma®); Oprelvekin (Neumega®); oxaliplatin (Eloxatin®); paclitaxel (Paxene®); paclitaxel (Taxol®); paclitaxel protein-bound particles (Abraxane®); palifermin (Kepivance®); pamidronate (Aredia®); pegademase (Adagen (Pegademase Bovine®); pegaspargase (Oncaspar®); Pegfilgrastim (Neulasta®); pemetrexed disodium (Alimta®); pentostatin (Nipent®); pipobroman (Vercyte®); plicamycin, mithramycin (Mithracin®); porfimer sodium (Photofrin®); procarbazine (Matulane®); quinacrine (Atabrine®); Rasburicase (Elitek®); Rituximab (Rituxan®); sargramostim (Leukine®); Sargramostim (Prokine®); sorafenib (Nexavar®); streptozocin (Zanosar®); sunitinib maleate (Sutent®); talc (Sclerosol®); tamoxifen (Nolvadex®); temozolomide (Temodar®); teniposide, VM-26 (Vumon®); testolactone (Teslac®); thioguanine, 6-TG (Thioguanine®); thiotepa (Thioplex®); topotecan (Hycamtin®); toremifene (Fareston®); Tositumomab (Bexxar®); Tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®); Trastuzumab (Herceptin®); tretinoin, ATRA (Vesanoid®); Uracil Mustard (Uracil Mustard Capsules®); valrubicin (Valstar®); vinblastine (Velban®); vincristine (Oncovin®); vinorelbine (Navelbine®); zoledronate (Zometa®) and vorinostat (Zolinza®).

20 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with taxanes.

 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with docetaxel (Taxotere®).

25 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with vorinostat (Zolinza®).

 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with the aurora kinase inhibitor, MK-0457.

 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with the mTor inhibitor, AP 23573.

30 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with the IGF1R inhibitor, MK-0646.

 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with satraplatin.

35 The compounds of the instant invention are useful for treating cancer in combination with lapatinib (Tykerb®).

 Thus, the scope of the instant invention encompasses the use of the instantly claimed compounds in combination with a second compound selected from: an estrogen receptor modulator, an androgen receptor modulator, a retinoid receptor modulator, a cytotoxic/cytostatic



agent, an antiproliferative agent, a prenyl-protein transferase inhibitor, an HMG-CoA reductase inhibitor, an HIV protease inhibitor, a reverse transcriptase inhibitor, an angiogenesis inhibitor, PPAR- γ agonists, PPAR- δ agonists, an inhibitor of inherent multidrug resistance, an anti-emetic agent, an agent useful in the treatment of anemia, an agent useful in the treatment of neutropenia, an immunologic-enhancing drug, an inhibitor of cell proliferation and survival signaling, a bisphosphonate, an aromatase inhibitor, an siRNA therapeutic, γ -secretase inhibitors, agents that interfere with receptor tyrosine kinases (RTKs), an agent that interferes with a cell cycle checkpoint and any of the therapeutic agents listed above.

The term "administration" and variants thereof (e.g., "administering" a compound) in reference to a compound of the invention means introducing the compound or a prodrug of the compound into the system of the animal in need of treatment. When a compound of the invention or prodrug thereof is provided in combination with one or more other active agents (e.g., a cytotoxic agent, etc.), "administration" and its variants are each understood to include concurrent and sequential introduction of the compound or prodrug thereof and other agents.

As used herein, the term "composition" is intended to encompass a product comprising the specified ingredients in the specified amounts, as well as any product which results, directly or indirectly, from combination of the specified ingredients in the specified amounts.

The term "therapeutically effective amount" as used herein means that amount of active compound or pharmaceutical agent that elicits the biological or medicinal response in a tissue, system, animal or human that is being sought by a researcher, veterinarian, medical doctor or other clinician.

The term "treating cancer" or "treatment of cancer" refers to administration to a mammal afflicted with a cancerous condition and refers to an effect that alleviates the cancerous condition by killing the cancerous cells, but also to an effect that results in the inhibition of growth and/or metastasis of the cancer.

In an embodiment, the angiogenesis inhibitor to be used as the second compound is selected from a tyrosine kinase inhibitor, an inhibitor of epidermal-derived growth factor, an inhibitor of fibroblast-derived growth factor, an inhibitor of platelet derived growth factor, an MMP (matrix metalloprotease) inhibitor, an integrin blocker, interferon- α , interleukin-12, pentosan polysulfate, a cyclooxygenase inhibitor, carboxyamidotriazole, combretastatin A-4, squalamine, 6-O-chloroacetyl-carbonyl)-fumagillol, thalidomide, angiostatin, troponin-1, or an antibody to VEGF. In an embodiment, the estrogen receptor modulator is tamoxifen or raloxifene.

Also included in the scope of the claims is a method of treating cancer that comprises administering a therapeutically effective amount of a compound of the instant invention in combination with radiation therapy and/or in combination with a second compound selected from: an estrogen receptor modulator, an androgen receptor modulator, a retinoid

receptor modulator, a cytotoxic/cytostatic agent, an antiproliferative agent, a prenyl-protein transferase inhibitor, an HMG-CoA reductase inhibitor, an HIV protease inhibitor, a reverse transcriptase inhibitor, an angiogenesis inhibitor, PPAR- γ agonists, PPAR- δ agonists, an inhibitor of inherent multidrug resistance, an anti-emetic agent, an agent useful in the treatment of anemia, an agent useful in the treatment of neutropenia, an immunologic-enhancing drug, an inhibitor of cell proliferation and survival signaling, a bisphosphonate, an aromatase inhibitor, an siRNA therapeutic, γ -secretase inhibitors, agents that interfere with receptor tyrosine kinases (RTKs), an agent that interferes with a cell cycle checkpoint and any of the therapeutic agents listed above.

The instant invention also includes a pharmaceutical composition useful for treating or preventing cancer that comprises a therapeutically effective amount of a compound of the instant invention and a second compound selected from: an estrogen receptor modulator, an androgen receptor modulator, a retinoid receptor modulator, a cytotoxic/cytostatic agent, an antiproliferative agent, a prenyl-protein transferase inhibitor, an HMG-CoA reductase inhibitor, an HIV protease inhibitor, a reverse transcriptase inhibitor, an angiogenesis inhibitor, a PPAR- γ agonist, a PPAR- δ agonist, an inhibitor of cell proliferation and survival signaling, a bisphosphonate, an aromatase inhibitor, an siRNA therapeutic, γ -secretase inhibitors, agents that interfere with receptor tyrosine kinases (RTKs), an agent that interferes with a cell cycle checkpoint and any of the therapeutic agents listed above.

All patents, publications and pending patent applications identified are hereby incorporated by reference.

Abbreviations used in the description of the chemistry and in the Examples that follow are: AEBSF (p-aminoethylbenzenesulfonyl fluoride); BSA (bovine serum albumin); BuLi (n-Butyl lithium); CDCl₃ (chloroform-d); CuI (copper iodide); CuSO₄ (copper sulfate); DCE (dichloroethane); DCM (dichloromethane); DEAD (diethyl azodicarboxylate); DMF (N,N-dimethylformamide); DMSO (dimethyl sulfoxide); DTT (dithiothreitol); EDTA (ethylene-diamine-tetra-acetic acid); EGTA (ethylene-glycol-tetra-acetic acid); EtOAc (ethyl acetate); EtOH (ethanol); HOAc (acetic acid); HPLC (high-performance liquid chromatography); HRMS (high resolution mass spectrum); IPA (isopropyl alcohol); LCMS (liquid chromatograph-mass spectrometer); LHMDs (lithium bis(trimethylsilyl)amide); LRMS (low resolution mass spectrum); MeOH (methanol); MP-B(CN)H₃ (Macroporous cyanoborohydride); NaHCO₃ (sodium bicarbonate); Na₂SO₄ (sodium sulfate); Na(OAc)₃BH (sodium triacetoxymethylborohydride); NH₄OAc (ammonium acetate); NBS (N-bromosuccinimide); NMR (nuclear magnetic resonance); PBS (phosphate buffered saline); PCR (polymerase chain reaction); Pd(dppf) ([1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene] palladium); Pd(Ph₃)₄ (palladium(0) tetrakis-triphenylphosphine); POCl₃ (phosphorous oxychloride); PS-DIEA (polystyrene diisopropylethylamine); PS-PPh₃ (polystyrene-triphenyl phosphine); TBAB (tetrabutylammonium bromide); TBAF (tetrabutylammonium fluoride); THF (tetrahydrofuran);

TFA (trifluoroacetic acid); TMSCH₂N₂ (trimethylsilyldiazomethane) and Ac (acetyl); BOC (t-butoxycarbonyl); Bu (butyl); Cal (calculated); Calc'd (calculated); DIEA (diisopropylethylamine); DMAP (4-dimethylaminopyridine); EDC (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide); Eq (equivalents); Et (ethyl); HOBT (hydroxybenzotriazole); IPA (isopropanol); LC/MS (liquid chromatograph-mass spectrometer); Me (methyl); MeCN (acetonitrile); NMP (N-methylpyrrolidinone); Pr (propyl); Pyr (pyridine); Sat (saturated); Tosic (p-toluenesulfonic acid) and Bn (benzyl); t-Bu (tert-butyl); dba (dibenzylideneacetone); DIPEA (diisopropylethylamine); IPAC (isopropyl acetate); MTBE (tert-butyl methyl ether); OAc (acetate); RT (room temperature); Wt (weight); and XRPD (x-ray powder diffraction).

The compounds of this invention may be prepared by employing reactions as shown in the following Reaction Schemes, in addition to other standard manipulations that are known in the literature or exemplified in the experimental procedures. The illustrative Reaction Schemes below, therefore, are not limited by the compounds listed or by any particular substituents employed for illustrative purposes. Substituent numbering as shown in the Reaction Schemes does not necessarily correlate to that used in the claims and often, for clarity, a single substituent is shown attached to the compound where multiple substituents are allowed under the definitions of Formula C or E hereinabove.

Synopsis of Reaction Schemes

The following Reaction Schemes, Reaction Schemes I - III, provide useful details for preparing the instant compounds. The requisite intermediates are in some cases commercially available or can be prepared according to literature procedures.

As illustrated in Reaction Scheme I, a cycloalkyl(phenyl)acetic acid derivative, in this case cyclobutyl, is first reacted and rearranged under Curtius-type conditions to give the carbamate **I-1**. Cyanation, in this case catalysed by palladium, gives nitrile **I-2**. Deprotonation of **I-2** followed by reaction with a nucleophilic benzyl Grignard reagent and hydrolytic work-up gives ketone **I-3**. Condensation of **I-3** with aldehyde **I-4** under basic conditions gives the chloronaphthyridine **I-5**. Displacement of the chlorine with hydrazine gives hydrazide **I-6**. Acylation gives acyl hydrazide **I-7** which is cyclized under acidic conditions gives the triazolonaphthyridine **I-8**. Deprotection of the amine, in this case with HCl, generates **I-9**.

The fused triazole may be prepared by acylating hydrazide **I-6** with an activated carbonyl equivalent such as carbonyldiimidazole or with formic acid in the presence of a carbodiimide, without the need for a cyclization step. Alternatively chloronaphthyridine **I-5** may be reacted with a derivatized hydrazine such as an alkyl hydrazine carboxylate under acid catalysis to give the hydrazine adduct which is cyclized to the triazole under basic conditions.

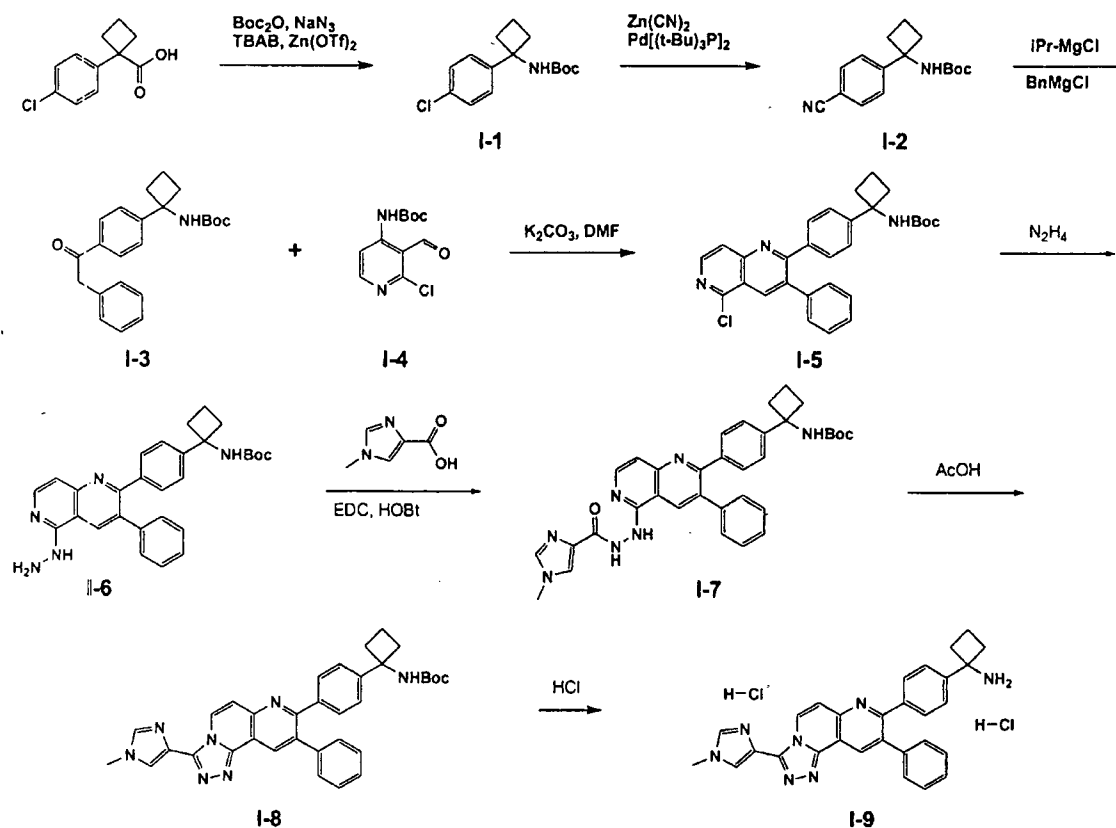
Compounds of the instant invention in which R¹ is an aminoalkyl group may be prepared according to the procedures outlined in reaction Scheme II. Hydrazide **I-6** is reacted

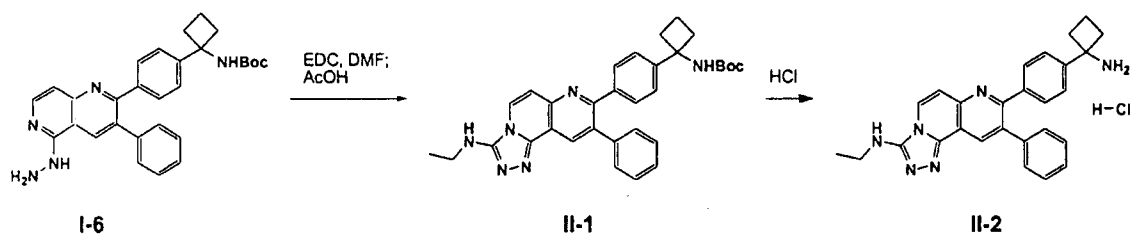
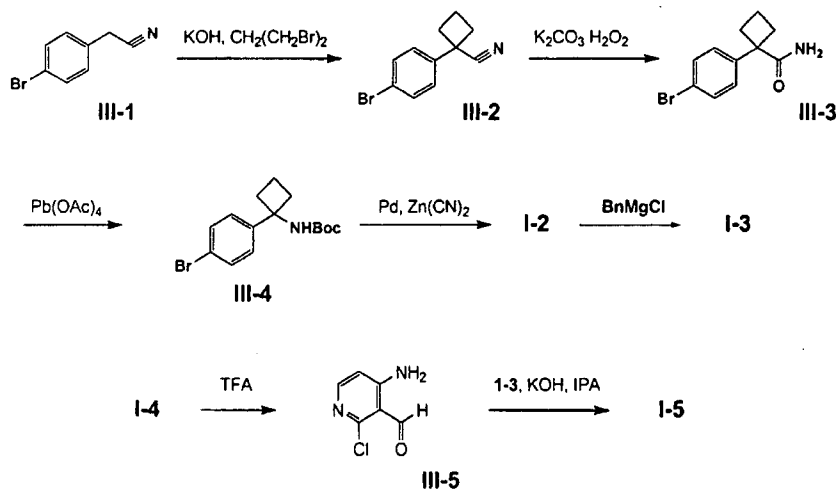
24

with a carbodiimide to generate a urea which is cyclized in situ under acidic conditions to give the alkylaminotriazole **II-1**. Deprotection then gives **II-2**.

An alternative synthesis of chloronaphthyridine **I-5** is illustrated in Reaction Scheme III. A (4-halophenyl)acetonitrile derivative **III-1**, in this case bromo, is first alkylated under basic conditions to give the cyclobutane **III-2** which is hydrated with hydrogen peroxide in the presence of base to give amide **III-3**. The amide is then oxidatively rearranged in the presence of t-butanol to give the carbamate **III-4**. Cyanation, in this case catalysed by palladium, gives nitrile **I-2**. Reaction of **I-2** with an excess of nucleophilic benzyl Grignard reagent and hydrolytic work-up gives ketone **I-3**. Deprotection of aldehyde **I-4** with an acid such as TFA gives the aminopyridine **III-5**. Condensation of **I-3** with aldehyde **III-5** under basic conditions gives the chloronaphthyridine **I-5**.

Reaction Scheme I



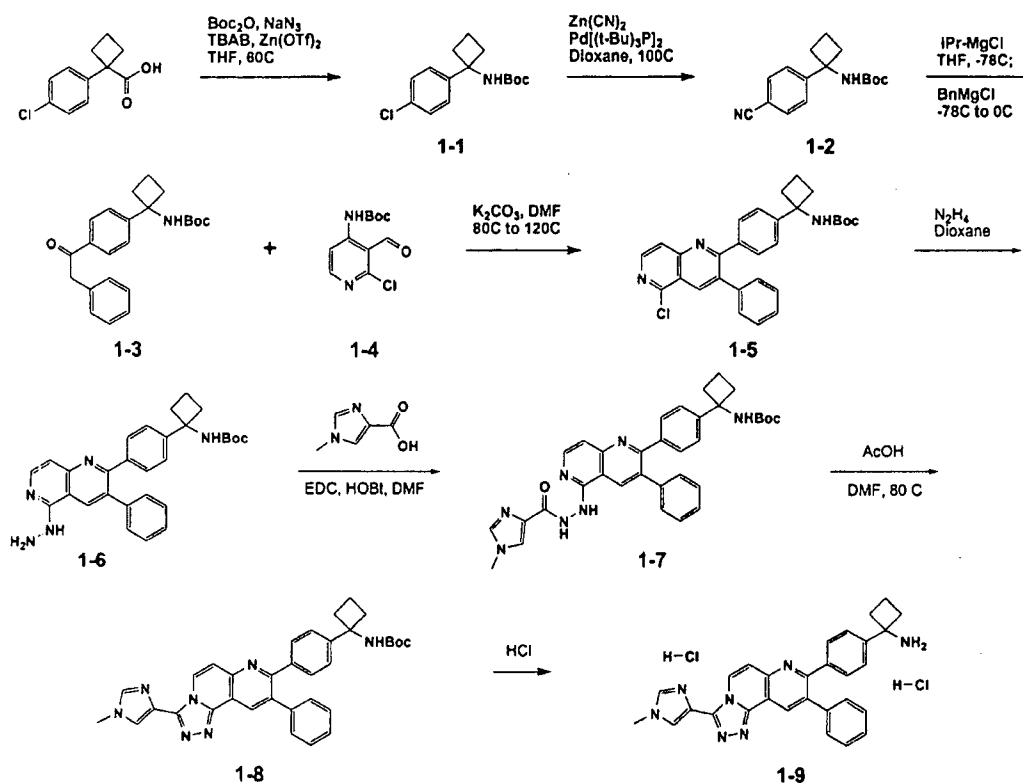
Reaction Scheme IIReaction Scheme III

5

EXAMPLES

Examples and schemes provided are intended to assist in a further understanding of the invention. Particular materials employed, species and conditions are intended to be further illustrative of the invention and do not limit the reasonable scope thereof.

SCHEME 1

tert-butyl [1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]carbamate (1-1)

5 To a round bottom flask was added 1-(4-chlorophenyl)cyclobutanecarboxylic acid (40.4 g, 192 mmol), di-tert-butyl dicarbonate (46.0 g, 211 mmol), sodium azide (43.6 g, 671 mmol), tetrabutylammonium bromide (9.27 g, 28.7 mmol), zinc trifluoromethanesulfonate (2.30 g, 6.32 mmol), and THF (1L). The reaction mixture was heated to 60°C while stirring in a hot oil bath with a water cooled reflux condenser attached under an atmosphere of nitrogen for 18

10 hours. To the crude reaction mixture was added a saturated solution of sodium bicarbonate, suspended in ethyl acetate and washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (0-3% IPA/DCM) to give *tert*-butyl [1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]carbamate (1-1) as a white solid. HRMS (M+Na)⁺: observed =

15 304.1075, calculated = 304.1075.

tert-butyl [1-(4-cyanophenyl)cyclobutyl]carbamate (1-2)

To a solution of *tert*-butyl [1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]carbamate (1-1) (5.32 g, 18.9 mmol) in anhydrous 1,4-dioxane (70 mL) was added zinc cyanide (2.44 g, 20.8 mmol), followed by bis(tri-*t*-butylphosphine)palladium(0) (0.965 g, 1.89 mmol). The reaction mixture

20 was heated to 100°C while stirring in a hot oil bath with a water cooled reflux condenser attached under an atmosphere of nitrogen for 1.5 hours. The reaction mixture was filtered, and

concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (0-5% IPA/DCM) to give *tert*-butyl [1-(4-cyanophenyl)cyclobutyl] (1-2) as a waxy off-white/ yellow solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 273.1598, calculated = 273.1597.

tert-butyl {1-[4-(phenylacetyl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-3)

5 A solution of *tert*-butyl [1-(4-cyanophenyl)cyclobutyl] carbamate (1-2) (16.6 g, 61.0 mmol) in anhydrous THF (300 mL) was cooled to -78°C while stirring under an atmosphere of nitrogen. Then a 2.0 M solution isopropylmagnesium chloride in THF (30.5 mL, 61.0 mmol) was added dropwise over 5 minutes. The reaction mixture was permitted to stir at -78°C under an atmosphere of nitrogen for 10 minutes. Then a 2.0 M solution of benzylmagnesium chloride
10 in THF (116 mL, 232 mmol) was added dropwise over 10 minutes. The reaction mixture was permitted to warm to 0°C. After 2 hours the reaction mixture was quenched at 0°C by addition of a saturated solution of ammonium chloride. The reaction was permitted to warm to room temperature, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of ammonium chloride, a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate,
15 filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (1-40% EtOAc/5% DCM/Hexane) to give *tert*-butyl {1-[4-(phenylacetyl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-3) as a waxy off-white solid. HRMS (M+Na)⁺: observed = 388.1892, calculated = 388.1883.

tert-butyl {1-[4-(5-chloro-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl] cyclobutyl} carbamate (1-5)

20 To a round bottom flask was added *tert*-butyl {1-[4-(phenylacetyl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-3) (2.7 g, 6.1 mmol), *tert*-butyl (2-chloro-3-formylpyridin-4-yl)carbamate (1-4) (1.6 g, 6.1 mmol), potassium carbonate (5.0 g, 6.0 mmol), and DMF (20 mL). The reaction mixture was heated to 80°C while stirring in a hot oil bath
25 under an atmosphere of nitrogen for 15 hours. Then the reaction mixture was warmed to 120°C for 1 hour. The reaction mixture was permitted to cool to room temperature, added water, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography (5-50% EtOAc/5%DCM/Hexane) to give *tert*-butyl
30 {1-[4-(5-chloro-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-5) as an off-white solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 486.1954, calculated = 486.1943.

tert-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6)

35 To a microwave vial was added *tert*-butyl {1-[4-(5-chloro-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-5) (4.05 g, 8.34 mmol), anhydrous hydrazine (5.24 mL, 167 mmol), and 1,4-dioxane (15 mL). The reaction mixture was then heated under microwave irradiation for 5 minutes at 100°C (high absorption). The reaction mixture was permitted to cool to room temperature, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated

solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6) as an orange solid/foam. MS (M+H)⁺: observed = 482.3, calculated = 482.59.

5 *tert*-butyl {1-[4-(5-{2-[(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)carbonyl]hydrazino}-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-7)

To a round bottom flask was added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6) (3.94 g, 8.18 mmol), EDC (1.34 g, 10.6 mmol), HOBt (1.44 g, 10.6 mmol), 1-methyl-1*H*-imidazole-4-carboxylic acid (1.34 g, 10.6 mmol), and DMF (40 mL). The reaction mixture was heated to 60°C while stirring under an atmosphere of nitrogen in a hot oil bath. After 45 minutes the reaction mixture was permitted to cool to room temperature, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(5-{2-[(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)carbonyl]hydrazino}-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-7) as red foam. MS (M+H)⁺: observed = 590.3, calculated = 590.69.

tert-butyl (1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutyl) carbamate (1-8)

To a round bottom flask was added *tert*-butyl {1-[4-(5-{2-[(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)carbonyl]hydrazino}-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-7) (2.73 g, 4.63 mmol), acetic acid (5.30 mL, 93 mmol), and 1,4-dioxane (20 mL). The reaction mixture was heated to 80°C while stirring open to the atmosphere (capped) in a hot oil bath. After 3 hours the reaction mixture was permitted to cool to room temperature, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography 1-15% IPA/DCM. The appropriate fractions were combined and the solvent was removed in vacuo. The resulting residue was repurified by reverse phase column chromatography (Sunfire C18) eluting with 5 to 95% acetonitrile / (0.1% TFA / water) gradient. The appropriate fractions were free based by suspending in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo to give *tert*-butyl (1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutyl) carbamate (1-8) as an off-white solid. MS (M+H)⁺: observed = 572.3, calculated = 572.7.

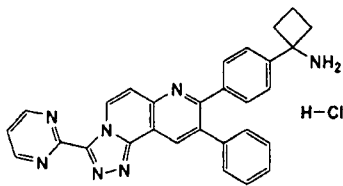
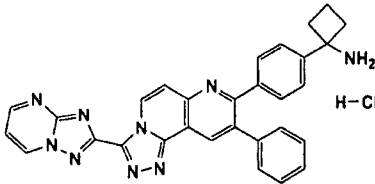
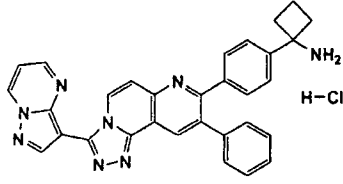
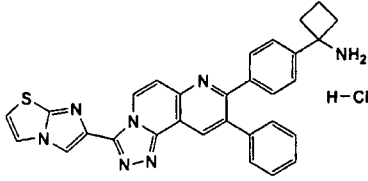
35 1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutanamine dihydrochloride (1-9)

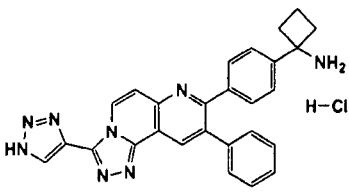
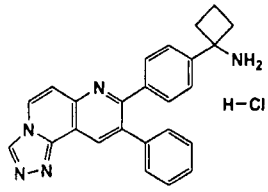
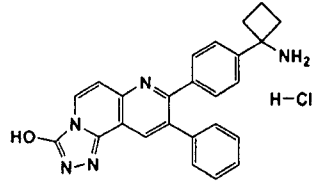
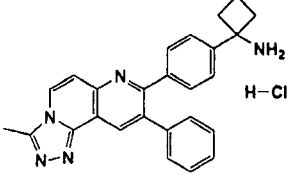
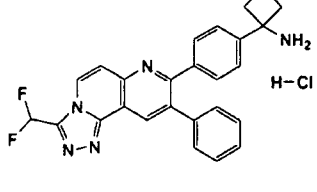
To a solution of *tert*-butyl (1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutyl) carbamate (1-8) (2.52 g, 4.41 mmol) in MeOH (5 mL) and DCM (15 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (22

mL, 88 mmol). The sealed reaction mixture was permitted to stir at room temperature. After 4 hours the reaction mixture was concentrated in vacuo to give 1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutanamine dihydrochloride (1-9) as a yellow solid. HRMS ($M+H$)⁺: observed = 472.2249, calculated =

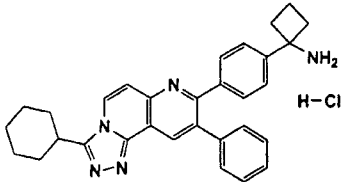
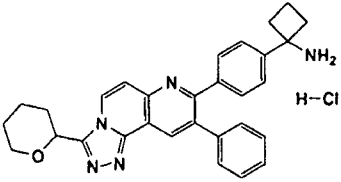
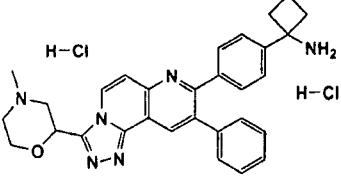
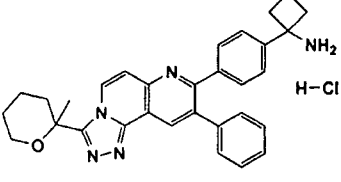
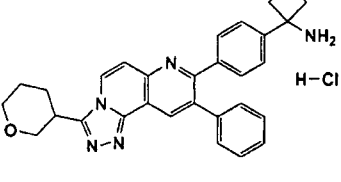
5 472.2244.

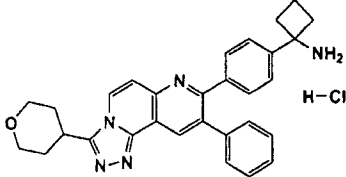
The following compounds were prepared in a similar fashion to Example 1-9:

Cmp	Structure	Calculated HRMS m/z ($M+H$) ⁺	Observed HRMS m/z ($M+H$) ⁺
1-10		470.2088	470.2068
1-11		510.2149	510.2124
1-12		509.2197	509.2192
1-13		514.1809	514.1799

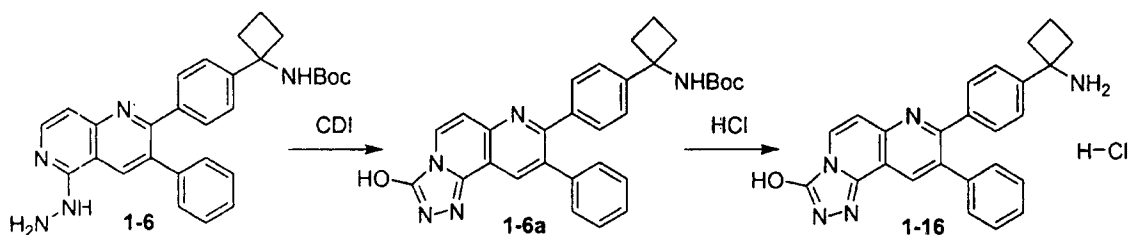
1-14	 <chem>Nc1cc2nc3c(ncn3c2c1Cc1ccccc1)C#N</chem> H-Cl	459.2040	459.2081
1-15	 <chem>Nc1cc2nc3c(ncn3c2c1Cc1ccccc1)C#N</chem> H-Cl	392.1870	392.1856
1-16	 <chem>Nc1cc2nc3c(ncn3c2c1Cc1ccccc1)C#N</chem> H-Cl	408.1819	408.1803
1-17	 <chem>Nc1cc2nc3c(ncn3c2c1Cc1ccccc1)C#N</chem> H-Cl	406.2026	406.2006
1-18	 <chem>Nc1cc2nc3c(ncn3c2c1Cc1ccccc1)C#N</chem> H-Cl	442.1838	442.1820

1-19	 <chem>CC(O)c1nc2nc3c(ncn3C=C2C(=C1)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=C(C=C6)C7(CCC7)N</chem> H-Cl	422.1976	422.1988
1-20	 <chem>COC(C)C1=NC2=C(N1)N=CN=C2C=C3C(=C(C=C3)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=C(C=C6)C7(CCC7)N</chem> H-Cl	436.2132	436.2130
1-21	 <chem>CC(C)(O)c1nc2nc3c(ncn3C=C2C(=C1)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=C(C=C6)C7(CCC7)N</chem> H-Cl	436.2132	436.2116
1-22	 <chem>CC(C)(C)(O)c1nc2nc3c(ncn3C=C2C(=C1)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=C(C=C6)C7(CCC7)N</chem> H-Cl	450.2289	450.2303
1-23	 <chem>C1CC1c2nc3c(ncn3C=C2C(=C1)C4=CC=CC=C4)C5=CC=CC=C5C6=CC=C(C=C6)C7(CCC7)N</chem> H-Cl	432.2183	432.2190

1-24		474.2652	474.2674
1-25		476.2445	476.2454
1-26		491.2554	491.2564
1-27		490.2602	490.2616
1-28		476.2445	476.2469

1-29		476.2445	476.2471
------	---	----------	----------

SCHEME 1A



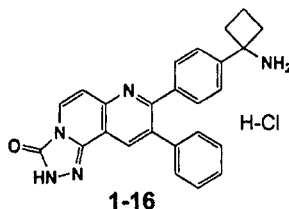
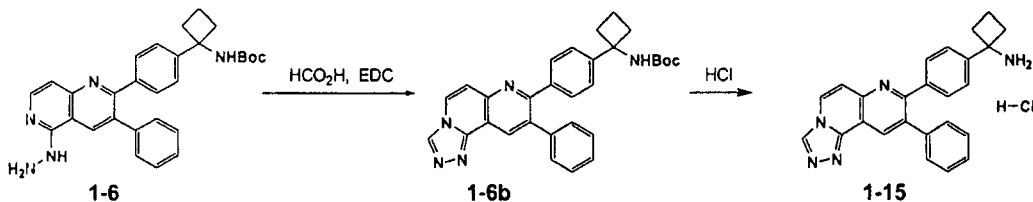
8-[4-(1-aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-3-ol (1-16)

5 To a round bottom flask was added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6**) (2.77 g, 5.75 mmol), and 1,1'-carbonylbis(1*H*-imidazole) (4.10 g, 4.40 mmol), in 1,4 Dioxane (30 mL). The sealed reaction mixture was then heated at 95°C under an atmosphere of nitrogen. To the crude reaction mixture was added a saturated solution of sodium bicarbonate (100 mL) and ethyl acetate. The organic layer was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, then brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated. The resulting residue was then purified by silica gel chromatography eluting with 0-10% IPA/DCM. The appropriate fractions were then combined and the solvent was removed in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(3-hydroxy-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6a**) as a tan solid. MS (M+H)⁺: observed = 508.1, calculated = 508.6.

To a solution of *tert*-butyl {1-[4-(3-hydroxy-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6a**) (1.14 g, 2.25 mmol) in MeOH (5 mL) and DCM (15 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (22 mL, 88 mmol) at room temperature. After 4 hours the reaction mixture was concentrated in vacuo to give 8-[4-(1-aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-3-ol hydrochloride (**1-16**) as a yellow solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 408.1803, calculated = 408.1819.

Subsequent, X-ray crystallographic analysis of the yellow solid indicates that solid Compound **1-16** exists as the following chemical structure:

8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-3(2*H*)-one hydrochloride

**SCHEME 1B**

5

tert-butyl {1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-15**)

To a round bottom flask was added EDC (569 mg, 2.97 mmol), HOBt (401 mg, 10.6 mmol), formic acid (248 mg, 5.40 mmol), DCM (20 mL), & NMP (2.5 mL). The reaction mixture was then stirred at room temperature under an atmosphere of nitrogen for 30 minutes. Then added added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6**) (1.30 g, 2.70 mmol). The reaction mixture was then permitted to stir overnight at room temperature under an atmosphere of nitrogen. The reaction mixture was then suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography 50-90% EtOAc/DCM, then 1-15% IPA/DCM. The appropriate fractions were combined and the solvent was removed in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6b**) as a tan solid. MS ($M+H$)⁺: observed = 492.2, calculated = 492.6.

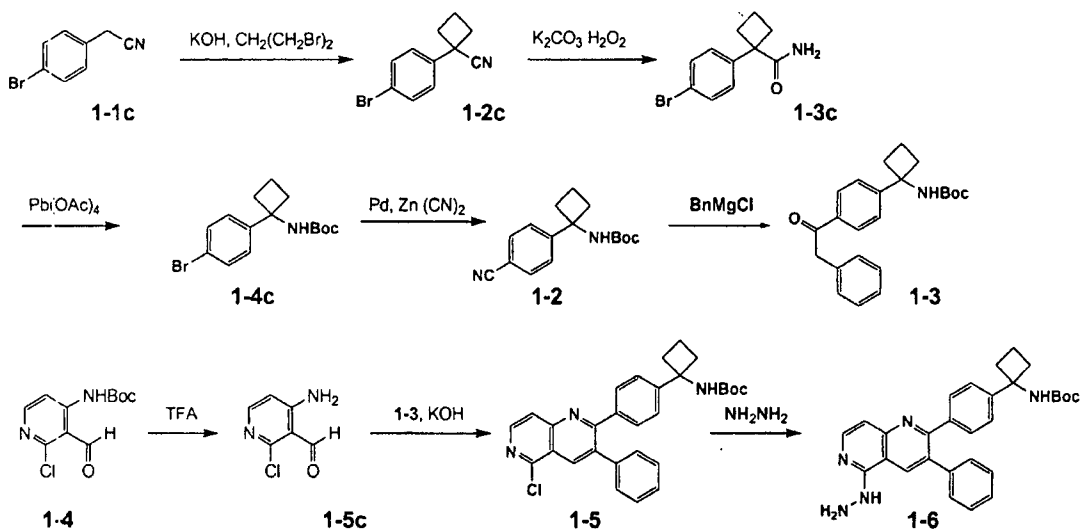
20

1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (**1-15**)

To a solution of *tert*-butyl {1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6b**) (1.07 g, 2.177 mmol) in MeOH (5 mL) and DCM (15 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (5.44 mL, 21.77 mmol). The sealed reaction mixture was permitted to stir at room temperature. After 4 hours the reaction mixture was filtered to give 1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (**1-15**) as a tan solid. HRMS ($M+H$)⁺: observed = 392.1872, calculated = 392.1870.

25

SCHEME 1C

1-(4-bromophenyl)cyclobutanecarbonitrile (1-2c)

5 TBAB (1.61 g, 0.5 mmol), dibromopropane (22.2 g, 110 mmol), and nitrile **1-1c** (19.6 g, 100 mmol) were added to a stirred solution of KOH (31.17 g, 500 mmol) in a mixture of 15 mL of water and 200 mL of toluene (temperature maintained between 72 and 79 °C). The mixture was heated by steam and was stirred at 99-108 °C for 2.5 h. The mixture was cooled to 80 °C and 200 mL of heptane was added. After the resulting mixture was cooled to RT with stirring, the top clear solution was filtered, washed with water (3X30 mL) and concentrated in vacuo to give oily product **1-2c**.

1-(4-bromophenyl)cyclobutanecarboxamide (1-3c)

15 H₂O₂ (30% 11.3 mL, 118 mmol) was added over 3 h to a stirred mixture of nitrile **1-2c** (13.88 g, ~58.9 mmol) and K₂CO₃ (1.62 g, 11.8 mol) in 59 mL of DMSO at 40-87 °C, cooling with a water bath. The resulting mixture was cooled to 27 °C and water (100 mL) was added over 30 min. Crystalline product **1-3c** formed. More water (100 mL) was added over 1 h. The resulting slurry was aged at RT for 16 h before filtration. The cake was rinsed with 100 mL of water and then with 100 mL of heptane. After drying in a vacuum oven at 50 °C, product **1-3c** was obtained as a white solid.

tert-butyl [1-(4-bromophenyl)cyclobutyl]carbamate (1-4c)

20 Pb(OAc)₄ (25.7 g, 25.7 mmol) was added to a stirred solution of amide **1-3c** (12.7 g, 50 mmol) in 64 mL of t-BuOH at 57 °C to 86 °C cooling with a water bath. The resulting mixture was stirred at 65-86 °C for 0.5 h. The mixture was cooled to 26 °C and 12.7 g of Na₂CO₃ were added followed by 65 mL MTBE. After 10 min, the mixture was filtered. The cake was rinsed with 10 L of MTBE and the combined filtrate was washed with 20 mL of water and the organic layer was then washed with 3 X 10 mL of 10% KHCO₃ (caution: bubbling) dried



over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The resulting solid was rinsed with 8 mL of IPAc and 8 mL of heptane and dried in a vacuum oven at 40 °C to give product **1-4c** as a grey solid.

tert-butyl [1-(4-cyanophenyl)cyclobutyl]carbamate (**1-2**)

A stirred slurry of Pd₂dba₃ (101 mg; 1 mol%) and dppf (122 mg; 2 mole%) in DMF (25 mL) was sparged with nitrogen for 5 min and then warmed to 65 °C and aged for 30 min. At this temp was added the aryl bromide **1-4c** (3.6 g, 11 mmol), zinc powder (51 mg; 6 mol%) and the zinc cyanide (777 mg; 0.60 equiv) rinsing with DMF (5 mL). The solution was heated to 92-95 °C and aged for 4 h. The solution was cooled to RT overnight and filtered through a pad of Solka Floc, rinsing the cake with DMF (5 mL). Water (30 mL) was added over 3.5 h at 25-33 °C, along with seed. After aging overnight at RT, the resulting crystalline solution was filtered and washed with aqueous methanol and dried overnight to yield **1-2** as a yellow solid.

tert-butyl {1-[4-phenylacetyl]phenyl}cyclobutyl}carbamate (**1-3**)

Benzyl Grignard (19 mL, 38.5 mmol) was added to a stirred, slightly cloudy solution of nitrile **1-2** (3 g, 11 mmol) in THF (25 mL) cooled to ca. -20 °C at a rate such that the reaction temperature did not warm above -10 °C. The solution was aged for 3-4 hours keeping the reaction temperature between -10 °C and -20 °C. The stirred solution was cooled to -30 °C and added to a 15 wt% aqueous citric acid solution (60 mL) which was previously cooled to 5-10 °C, maintaining the temperature below 15 °C. The layers were separated and the aqueous layer was washed with MTBE.

The organic layers were combined, washed with half saturated brine (60 mL), and concentrated under reduced pressure. Heptane was added and the mixture was concentrated to a slurry which was filtered, washed with heptane (15 mL) and dried under nitrogen to give **1-3**.

4-Amino-2-chloronicotinaldehyde (**1-5c**)

Trifluoroacetic acid (17.4 mL, 234 mmol) was added carefully to a stirred mixture of Boc aldehyde **1-4** (20 g, 78.1 mmol) and dichloromethane (60 mL) keeping the temperature below 25 °C. The solution was warmed to 35 °C, aged overnight (vigorous off-gassing) and then cooled to room temperature. 25 mL of MTBE was added and the resulting white slurry was aged for one hour, filtered, and the filter cake rinsed with MTBE (10 mL x 2). Solid **1-5c** TFA salt was dried under vacuum.

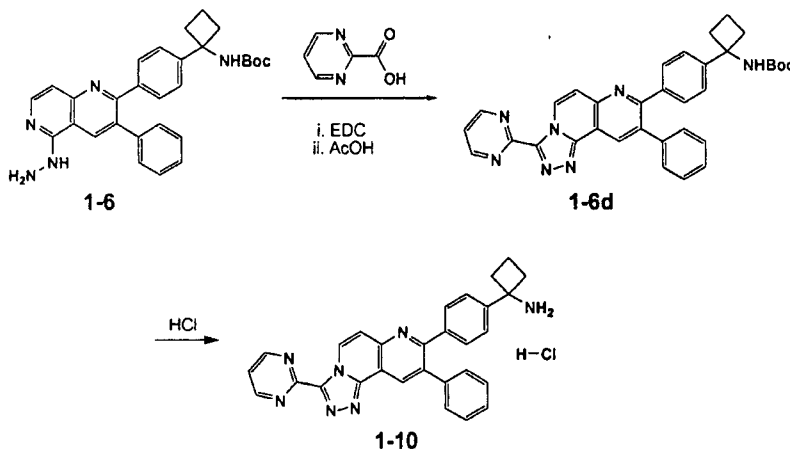
tert-butyl {1-[4-(5-chloro-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-5**)

45wt% Potassium hydroxide solution (18 mL; 5 equiv) was added dropwise over 20 minutes to a stirred mixture of chloropyridine TFA salt **1-5c** (19.5 g), cyclobutylamino ketone **1-3** (26 g) and isopropanol (200 mL) keeping the temperature below 24 °C. After 1 h, water (100 mL) was added and after a further 1 h the resulting slurry was filtered, washing with 2:1 IPA/water (30 mL, then 24 mL) then with water (80 mL then 2 x 60 mL). The solid was dried under nitrogen flow to afford **1-5** as an off-white solid.

tert-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6)

Anhydrous hydrazine (25 mL, 797 mmol) was added to a stirred solution of chloronaphthyridine (1-5) (25.12 g, 51.7 mmol) in 1,4-dioxane (200 mL) under an atmosphere of nitrogen and the reaction mixture was heated to 95°C. After 30 min the solution was cooled to room temperature, ethyl acetate (400 mL) was added and the solution was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water and brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo to give (1-6) as an orange solid.

SCHEME 1D



tert-butyl {1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6d)

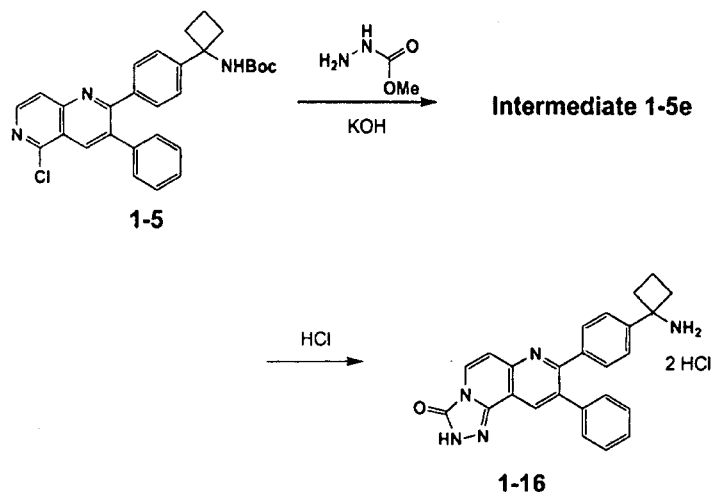
To a round bottom flask was added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6) (267 mg, 0.554 mmol), EDC (138 mg, 0.721 mmol), HOBt (97 mg, 0.721 mmol), pyrimidine-2-carboxylic acid (89 mg, 0.721 mmol), DIPEA (0.367 mL, 2.218 mmol), and DMF (3 mL). The reaction mixture was then capped & heated under microwave irradiation at 100°C for 5 minutes. The mixture was cooled, acetic acid (0.476 mL, 8.32 mmol) was added and the reaction was then capped & heated under microwave irradiation at 80°C for 5 minutes. The reaction mixture was permitted to cool to room temperature, suspended in ethyl acetate, washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water, brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography 0-10% IPA/DCM. The appropriate fractions were combined and the solvent was removed in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6d) as an orange solid. MS (M+H)⁺: observed = 570.2, calculated = 570.7.

1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl] cyclobutanamine hydrochloride (1-10)

52

To a solution of *tert*-butyl {1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6d**) (71 mg, 0.125 mmol) in MeOH (2 mL) and DCM (3 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (3 mL, 12 mmol). The sealed reaction mixture was permitted to stir at room temperature. After 4 hours the reaction mixture was concentrated. After 4 hours the reaction mixture was concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by reverse phase column chromatography (Sunfire C18) eluting with 1 to 50% acetonitrile / (0.1% TFA / water) gradient. The appropriate fractions were concentrated in vacuo. The resulting residue was then dissolved in DCM (5 mL) & MeOH (5 mL), then added a 4N solution of HCl in EtOAc (5 mL, 20 mmol), then concentrated in vacuo to give 1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (**1-10**) as a tan solid. HRMS ($M+H$)⁺: observed = 470.2098, calculated = 470.2088.

SCHEME 1E
(ALTERNATE SYNTHESIS FOR COMPOUND 1-16)



Intermediate (1-5e)

A stirred slurry of chloronaphthyridine **1-5** (1.8 g), methyl hydrazine carboxylate (0.318 g) and isopropanol (20 L) is warmed to 66 °C before becoming homogeneous. 5-6 N HCl in IPA (0.05 mL) is added and the temperature is increased to 70 °C for 16 hours and then is cooled to RT. After cooling to RT, 45wt% potassium hydroxide solution (0.52 mL) is mixed with water (5.5 mL) and added over 15 minutes. After 30 minutes, aqueous acetic acid (0.7 mL in 6 mL water) is added followed by water (2 mL). The resulting slurry is aged at RT for three hours, filtered and washed with 1:1 IPA/water (2 x 2.4 mL). The product is dried under nitrogen flow then slurried in methylene chloride at 20 °C for 4 hours, filtered and dried under nitrogen flow to afford **1-5e** as an off-white solid.

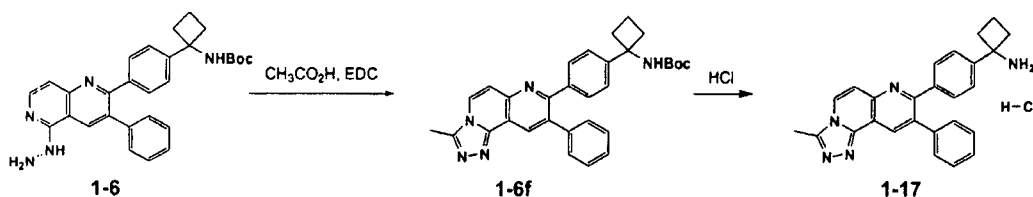
8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-3(2H)-one (**1-16**)

A solution of aqueous concentrated HCl (12.1 M, 1.64 mL) in ethanol (2.0 mL) was added dropwise over 30 min to a stirred slurry of **1-5e** (500 mg, 0.985 mol) in ethanol (1.7 mL) and water (0.2 mL) at 50°C. After 3 hours following acid addition, the mixture was seeded and aged overnight at 50°C, cooled to room temperature and filtered. Acetyl chloride (0.5 g, 7 mmol) was added over 1 h to ethanol (2 mL) at 0°C. The solution was then cooled to room temperature and aged for 30 minutes. The filter cake was washed with this solution (1 mL x 2), then with ethyl acetate (4 mL x 2) and dried, finally in a vacuum oven at 75.0°C with nitrogen sweep (50 torr) until complete conversion from **1-16** Form IV to Form II is seen by XRPD.

The method employed in Scheme 1A gave a crystalline bis-HCl salt **1-16** denoted Form I. The procedures described in Scheme 1E produced three new polymorphs of the bis-HCl salt **1-16**, denoted Forms II, III and IV. It was found that drying either Form III or Form IV under reduced pressure with a nitrogen sweep converted them entirely to Form II. Slurrying a mixture of Form I and II in acidic ethanol produced Form III in the slurry. Isolating Form III and drying as described above produces Form II.

A mono-HCl version of **1-16** was also produced via dissolution in water. After 6 hours, the aqueous slurry turns light yellow and is filtered. Silver chloride titration of this solid reveals the presence of one equivalent of chloride. Finally, treating the bis-HCl salt **1-16** with aqueous KOH (2 equiv) produces neutral **1-16** as determined by chloride titration.

SCHEME 1F



tert-butyl {1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6f**)

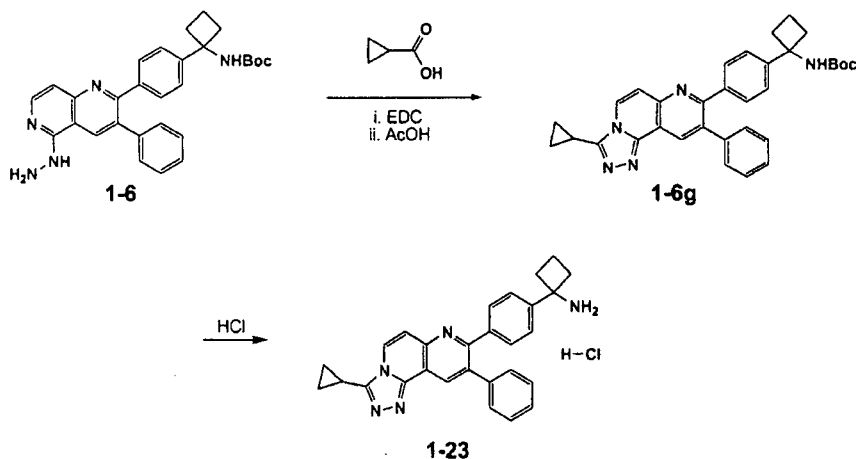
To a round bottom flask was added EDC (4.63 g, 24.17 mmol), HOBT (3.27 g, 24.17 mmol), anhydrous DCM (50 mL) and acetic acid (13.2 mL, 13.86 mmol). The reaction mixture was then stirred at room temperature under an atmosphere of nitrogen for 30 minutes. Then added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6**) (10.58 g, 21.97 mmol). The reaction mixture was then permitted to stir overnight (18 hours) at room temperature under an atmosphere of nitrogen, then heated to 80°C for 2 hours. The reaction mixture was then suspended in ethyl acetate, slowly poured into a saturated solution of sodium bicarbonate, followed by water and brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography 1-20% IPA/DCM. The appropriate fractions were combined and the solvent was removed in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-

naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6f**) as a tan solid. MS (M+H)⁺: observed = 506.2, calculated = 506.6.

1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]
cyclobutanamine hydrochloride (**1-17**)

To a solution of *tert*-butyl {1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6f**) (9.23 g, 18.26 mmol) in MeOH (20 mL) and DCM (100 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (91 mL, 365 mmol). The sealed reaction mixture was permitted to stir at room temperature. After 18 hours the reaction mixture was filtered to give 1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (**1-17**) as an off-white solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 406.2047, calculated = 406.2026.

SCHEME 1G



tert-butyl {1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6g**)

To a round bottom flask was added EDC (535 mg, 2.79 mmol), HOBT (377 mg, 2.79 mmol), anhydrous DCM (17.5 mL), anhydrous NMP (.25 mL), and cyclopropanecarboxylic acid (248 mg, 5.40 mmol). The reaction mixture was then stirred at room temperature under an atmosphere of nitrogen for 30 minutes. Then added added *tert*-butyl {1-[4-(5-hydrazino-3-phenyl-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (**1-6**) (1.221 g, 2.54 mmol). The reaction mixture was then permitted to stir overnight (18 hours) at room temperature under an atmosphere of nitrogen. Acetic acid (2.178 mL, 38.0 mmol) was added and the reaction mixture was heated in a hot oil bath at 80°C for 2 hours. The reaction mixture was permitted to cool to room temperature and ethyl acetate was added and the mixture was washed with a saturated solution of sodium bicarbonate, water and brine, dried over sodium sulfate, filtered, and concentrated in vacuo. The resulting residue was purified by silica gel chromatography 90% EtOAc/DCM (isocratic). The appropriate fractions were combined and the solvent was removed in vacuo to give *tert*-butyl {1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-

8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (1-6g) as a pink solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 532.2729, calculated = 532.2707.

1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (1-23)

5 To a solution of *tert*-butyl {1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate (MJK-9) (899.4 mg, 18.26 mmol) in MeOH (5 mL) and DCM (15 mL) was added a 4N solution of HCl in EtOAc (4.23 mL, 16.92 mmol). The sealed reaction mixture was permitted to stir at room temperature. After 18 hours the reaction mixture was filtered to give 1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine hydrochloride (1-23) as a yellow solid. HRMS (M+H)⁺: observed = 432.2186, calculated = 432.2183.

EXAMPLE 1

Cloning of the human Akt isoforms and ΔPH-Akt1

The pS2neo vector (deposited in the ATCC on April 3, 2001 as ATCC PTA-3253) was prepared as follows: The pRmHA3 vector (prepared as described in *Nucl. Acid Res.* 16:1043-1061 (1988)) was cut with BglII and a 2734 bp fragment was isolated. The pUCHsneo vector (prepared as described in *EMBO J.* 4:167-171 (1985)) was also cut with BglII and a 4029 bp band was isolated. These two isolated fragments were ligated together to generate a vector termed pS2neo-1. This plasmid contains a polylinker between a metallothionine promoter and an alcohol dehydrogenase poly A addition site. It also has a neo resistance gene driven by a heat shock promoter. The pS2neo-1 vector was cut with Psp5II and BsiWI. Two complementary oligonucleotides were synthesized and then annealed (CTGCGGCCGC (SEQ.ID.NO.: 1) and GTACGCGGCCGCAG (SEQ.ID.NO.: 2)). The cut pS2neo-1 and the annealed oligonucleotides were ligated together to generate a second vector, pS2neo. Added in this conversion was a NotI site to aid in the linearization prior to transfection into S2 cells.

Human Akt1 gene was amplified by PCR (Clontech) out of a human spleen cDNA (Clontech) using the 5' primer: 5'CGCGAATTCAGATCTACCATGAGCGACGTGGCTATTGTG 3' (SEQ.ID.NO.: 3), and the 3' primer: 5'CGCTCTAGAGGATCCTCAGGCCGTGCTGCTGGC3' (SEQ.ID.NO.: 4). The 5' primer included an EcoRI and BglII site. The 3' primer included an XbaI and BamHI site for cloning purposes. The resultant PCR product was subcloned into pGEM3Z (Promega) as an EcoRI/Xba I fragment. For expression/purification purposes, a middle T tag was added to the 5' end of the full length Akt1 gene using the PCR primer: 5'GTACGATGCTGAACGATATCTTCG 3' (SEQ.ID.NO.: 5). The resulting PCR product encompassed a 5' KpnI site and a 3' BamHI site which were used to subclone the fragment in frame with a biotin tag containing insect cell expression vector, pS2neo.

For the expression of a pleckstrin homology domain (PH) deleted (Δaa 4-129, which includes deletion of a portion of the Akt1 hinge region) version of Akt1, PCR deletion

mutagenesis was done using the full length Akt1 gene in the pS2neo vector as template. The PCR was carried out in 2 steps using overlapping internal primers (5'GAATACATGCCGATGGAAAGCGACGGGGCTGAAGAGATGGAGGTG 3' (SEQ.ID.NO.: 6), and 5'CCCCTCCATCTCTTCAGCCCCGTCGCTTTCCATCGGCATG TATTC 3' (SEQ.ID.NO.: 7)) which encompassed the deletion and 5' and 3' flanking primers which encompassed the KpnI site and middle T tag on the 5' end. The final PCR product was digested with KpnI and SmaI and ligated into the pS2neo full length Akt1 KpnI/SmaI cut vector, effectively replacing the 5' end of the clone with the deleted version.

Human Akt3 gene was amplified by PCR of adult brain cDNA (Clontech) using the amino terminal oligo primer:
5' GAATTCAGATCTACCATGAGCGATGTTACCATTGTG 3' (SEQ.ID.NO.: 8); and the carboxy terminal oligo primer :

5' TCTAGATCTTATTCTCGTCCACTTGCAGAG 3'(SEQ.ID.NO.: 9).

These primers included a 5' EcoRI/BglII site and a 3' XbaI/BglII site for cloning purposes. The resultant PCR product was cloned into the EcoRI and XbaI sites of pGEM4Z (Promega). For expression/purification purposes, a middle T tag was added to the 5' end of the full length Akt3 clone using the PCR primer:

5'GGTACCATGGAATACATGCCGATGGAAAGCGATGTTACCATTGTGAAG

3'(SEQ.ID.NO.: 10). The resultant PCR product encompassed a 5' KpnI site which allowed in frame cloning with the biotin tag containing insect cell expression vector, pS2neo.

Human Akt2 gene was amplified by PCR from human thymus cDNA (Clontech) using the amino terminal oligo primer:

5' AAGCTTAGATCTACCATGAATGAGGTGTCTGTC 3' (SEQ.ID.NO.: 11); and the carboxy terminal oligo primer: 5'GAATTCGGATCCTCACTCGCGGATGCTGGC 3' (SEQ.ID.NO.:

12). These primers included a 5' HindIII/BglII site and a 3' EcoRI/BamHI site for cloning purposes. The resultant PCR product was subcloned into the HindIII/EcoRI sites of pGem3Z (Promega). For expression/purification purposes, a middle T tag was added to the 5' end of the full length Akt2 using the PCR primer:

5'GGTACCATGGAATACATGCCGATGGAAAATGAGGTGTCTGTCATCAAAG 3'

(SEQ.ID.NO.: 13). The resultant PCR product was subcloned into the pS2neo vector as described above.

EXAMPLE 2

Expression of human Akt isoforms and ΔPH-Akt1

The DNA containing the cloned Akt1, Akt2, Akt3 and ΔPH-Akt1 genes in the pS2neo expression vector was purified and used to transfect *Drosophila* S2 cells (ATCC) by the calcium phosphate method. Pools of antibiotic (G418, 500 μg/ml) resistant cells were selected. Cell were expanded to a 1.0 L volume (~7.0 x 10⁶ / ml), biotin and CuSO₄ were added to a final

concentration of 50 μ M and 50 mM respectively. Cells were grown for 72 h at 27°C and harvested by centrifugation. The cell paste was frozen at -70°C until needed.

EXAMPLE 3

Purification of human Akt isoforms and Δ PH-Akt1

5 Cell paste from one liter of S2 cells, described in Example 2, was lysed by sonication with 50 mls 1% CHAPS in buffer A: (50mM Tris pH 7.4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0.2mM AEBSF, 10 μ g/ml benzamidine, 5 μ g/ml of leupeptin, aprotinin and pepstatin each, 10% glycerol and 1mM DTT). The soluble fraction was purified on a Protein G Sepharose fast flow (Pharmacia) column loaded with 9mg/ml anti-middle T monoclonal antibody and eluted with 75
10 μ M EYMPME (SEQ.ID.NO.: 14) peptide in buffer A containing 25% glycerol. Akt/PKB containing fractions were pooled and the protein purity evaluated by SDS-PAGE. The purified protein was quantitated using a standard Bradford protocol. Purified protein was flash frozen on liquid nitrogen and stored at -70°C.

Akt and Akt pleckstrin homology domain deletions purified from S2 cells
15 required activation. Akt and Akt pleckstrin homology domain deletions were activated (Alessi et al. *Current Biology* 7:261-269) in a reaction containing 10 nM PDK1 (Upstate Biotechnology, Inc.), lipid vesicles (10 μ M phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate – Metreya, Inc, 100 μ M phosphatidylcholine and 100 μ M phosphatidylserine – Avanti Polar lipids, Inc.) and activation buffer (50 mM Tris pH7.4, 1.0 mM DTT, 0.1 mM EGTA, 1.0 μ M Microcystin-LR, 0.1 mM
20 ATP, 10 mM MgCl₂, 333 μ g/ml BSA and 0.1mM EDTA). The reaction was incubated at 22°C for 4 hours. Aliquots were flash frozen in liquid nitrogen.

EXAMPLE 4

Akt Kinase Assays

Activated Akt isoforms and pleckstrin homology domain deletion constructs were
25 assayed utilizing a GSK-derived biotinylated peptide substrate. The extent of peptide phosphorylation was determined by Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) using a lanthanide chelate(Lance)-coupled monoclonal antibody specific for the phosphopeptide in combination with a streptavidin-linked allophycocyanin (SA-APC) fluorophore which will bind to the biotin moiety on the peptide. When the Lance and APC are in proximity (i.e. bound to the same phosphopeptide molecule), a non-radiative energy transfer takes place from the Lance to the APC, followed by emission of light from APC at 665 nm.
30

Materials required for the assay:

- A. Activated Akt isozyme or pleckstrin homology domain deleted construct
- B. Akt peptide substrate: GSK3 α (S21) Peptide #3928 biotin-GGRARTSSFAEPG
35 (SEQ.ID.NO.:15), Macromolecular Resources.
- C. Lance labeled anti-phospho GSK3 α monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, clone # 27).
- D. SA-APC (Prozyme catalog no. PJ25S lot # 896067).

56

- E. Microfluor® B U Bottom Microtiter Plates (Dynex Technologies, Catalog no. 7205).
- F. Discovery® HTRF Microplate Analyzer, Packard Instrument Company.
- G. 100 X Protease Inhibitor Cocktail (PIC): 1 mg/ml benzamidine, 0.5 mg/ml pepstatin, 0.5 mg/ml leupeptin, 0.5 mg/ml aprotinin.
- H. 10X Assay Buffer: 500 mM HEPES, pH 7.5, 1% PEG, mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% BSA, 20 mM 9-Glycerol phosphate.
- I. Quench Buffer: 50 mM HEPES pH 7.3, 16.6 mM EDTA, 0.1% BSA, 0.1% Triton X-100, 0.17 nM Lance labeled monoclonal antibody clone # 27, 0.0067 mg/ml SA-APC
- 10 J. ATP/MgCl₂ working solution: 1X Assay buffer, 1 mM DTT, 1X PIC, 125 mM KCl, 5% Glycerol, 25 mM MgCl₂, 375 TM ATP
- K. Enzyme working solution: 1X Assay buffer, 1 mM DTT, 1X PIC, 5% Glycerol, active Akt. The final enzyme concentrations were selected so that the assay was in a linear response range.
- 15 L. Peptide working solution: 1X Assay buffer, 1 mM DTT, 1X PIC, 5% Glycerol, 2 TM GSK3 biotinylated peptide # 3928

The reaction is assembled by adding 16 TL of the ATP/MgCl₂ working solution to the appropriate wells of a 96-well microtiter plate. Inhibitor or vehicle (1.0 Tl) is added followed by 10 Tl of peptide working solution. The reaction is started by adding 13 Tl of the enzyme working solution and mixing. The reaction is allowed to proceed for 50 min and then stopped by the addition of 60 Tl HTRF quench buffer. The stopped reactions were incubated at room temperature for at least 30 min and then read on the Discovery instrument.

Procedure for Streptavidin Flash Plate Assay:

Step 1:

- 25 A 1 µl solution of the test compound in 100% DMSO was added to 20 µl of 2X substrate solution (20 uM GSK3 Peptide, 300 µM ATP, 20 mM MgCl₂, 20 µCi / ml [³³P] ATP, 1X Assay Buffer, 5% glycerol, 1 mM DTT, 1X PIC, 0.1% BSA and 100 mM KCl). Phosphorylation reactions were initiated by adding 19 µl of 2X Enzyme solution (6.4 nM active Akt/PKB, 1X Assay Buffer, 5% glycerol, 1 mM DTT, 1X PIC and 0.1% BSA). The reactions
- 30 were then incubated at room temperature for 45 minutes.

Step 2:

- The reaction was stopped by adding 170 µl of 125 mM EDTA. 200 µl of stopped reaction was transferred to a Streptavidin Flashplate® PLUS (NEN Life Sciences, catalog no. SMP103). The plate was incubated for ≥10 minutes at room temperature on a plate shaker. The
- 35 contents of each well was aspirated, and the wells rinsed 2 times with 200 µl TBS per well. The wells were then washed 3 times for 5 minutes with 200 µl TBS per well with the plates incubated at room temperature on a platform shaker during wash steps.

SA

The plates were covered with sealing tape and counted using the Packard TopCount with the appropriate settings for counting [^{33}P] in Flashplates.

Procedure for Streptavidin Filter Plate Assay:

Step 1:

5 The enzymatic reactions as described in Step 1 of the Streptavidin Flash Plate Assay above were performed.

Step 2:

10 The reaction was stopped by adding 20 μl of 7.5M Guanidine Hydrochloride. 50 μl of the stopped reaction was transferred to the Streptavidin filter plate (SAM²™ Biotin Capture Plate, Promega, catalog no. V7542) and the reaction was incubated on the filter for 1-2 minutes before applying vacuum.

15 The plate was then washed using a vacuum manifold as follows: 1) 4 x 200 μl /well of 2M NaCl; 2) 6 x 200 μl /well of 2M NaCl with 1% H_3PO_4 ; 3) 2 x 200 μl /well of dH_2O ; and 4) 2 x 100 μl /well of 95% Ethanol. The membranes were then allowed to air dry completely before adding scintillant.

The bottom of the plate was sealed with white backing tape, 30 μl /well of Microscint 20 (Packard Instruments, catalog no. 6013621) was added. The top of the plate was sealed with clear sealing tape, and the plate then counted using the Packard TopCount with the appropriate settings for [^{33}P] with liquid scintillant.

20 Procedure for Phosphocellulose Filter Plate Assay:

Step 1:

The enzymatic reactions were performed as described in Step 1 of the Streptavidin Flash Plate Assay (above) utilizing KKGGRARTSSFAEPG (SEQ.ID.NO.: 16) as the substrate in place of biotin-GGRARTSSFAEPG.

25 Step 2:

The reaction was stopped by adding 20 μl of 0.75% H_3PO_4 . 50 μl of stopped reaction was transferred to the filter plate (UNIFILTER™, Whatman P81 Strong Cation Exchanger, White Polystyrene 96 Well Plates, Polyfiltronics, catalog no. 7700-3312) and the reaction incubated on the filter for 1-2 minutes before applying vacuum.

30 The plate was then washed using a vacuum manifold as follows: 1) 9 x 200 μl /well of 0.75% H_3PO_4 ; and 2) 2 x 200 μl /well of dH_2O . The bottom of the plate was sealed with white backing tape, then 30 μl /well of Microscint 20 was added. The top of the plate was sealed with clear sealing tape, and the plate counted using the Packard TopCount with the appropriate settings for [^{33}P] and liquid scintillant.

35 PKA assay:

Each individual PKA assay consists of the following components:

A. 5X PKA assay buffer (200 mM Tris pH7.5, 100 mM MgCl_2 , 5mM β -mercaptoethanol, 0.5 mM EDTA)

CB

- B. 50 μ M stock of Kemptide (Sigma) diluted in water
C. 33 P-ATP prepared by diluting 1.0 μ l 33 P-ATP [10 mCi/ml] into 200 Tl of a 50 μ M stock of unlabeled ATP
D. 10 μ l of a 70 nM stock of PKA catalytic subunit (UBI catalog # 14-114) diluted in
5 0.5 mg/ml BSA
E. PKA/Kemptide working solution: equal volumes of 5X PKA assay buffer, Kemptide solution and PKA catalytic subunit.

The reaction is assembled in a 96 deep-well assay plate. The inhibitor or vehicle (10 Tl) is added to 10 Tl of the 33 P-ATP solution. The reaction is initiated by adding 30 Tl of the
10 PKA/Kemptide working solution to each well. The reactions were mixed and incubated at room temperature for 20 min. The reactions were stopped by adding 50 Tl of 100 mM EDTA and 100 mM sodium pyrophosphate and mixing.

The enzyme reaction product (phosphorylated Kemptide) was collected on p81 phosphocellulose 96 well filter plates (Millipore). To prepare the plate, each well of a p81 filter
15 plate was filled with 75 mM phosphoric acid. The wells were emptied through the filter by applying a vacuum to the bottom of the plate. Phosphoric acid (75 mM, 170 μ l) was added to each well. A 30 μ l aliquot from each stopped PKA reaction was added to corresponding wells on the filter plate containing the phosphoric acid. The peptide was trapped on the filter following the application of a vacuum and the filters were washed 5 times with 75 mM phosphoric acid.
20 After the final wash, the filters were allowed to air dry. Scintillation fluid (30 μ l) was added to each well and the filters counted on a TopCount (Packard).

PKC assay:

Each PKC assay consists of the following components:

- A. 10X PKC co-activation buffer: 2.5 mM EGTA, 4mM CaCl_2
25 B. 5X PKC activation buffer: 1.6 mg/ml phosphatidylserine, 0.16 mg/ml diacylglycerol, 100 mM Tris pH 7.5, 50 mM MgCl_2 , 5 mM β -mercaptoethanol
C. 33 P-ATP prepared by diluting 1.0 μ l 33 P-ATP [10 mCi/ml] into 100 μ l of a 100 μ M stock of unlabeled ATP
D. Myelin basic protein (350 μ g/ml, UBI) diluted in water
30 E. PKC (50ng/ml, UBI catalog # 14-115) diluted into 0.5 mg/ml BSA
F. PKC/Myelin Basic Protein working solution: Prepared by mixing 5 volumes each of PKC co-activation buffer and Myelin Basic protein with 10 volumes each of PKC activation buffer and PKC.

The assays were assembled in 96 deep-well assay plates. Inhibitor or vehicle (10
35 Tl) was added to 5.0 μ l of 33 P-ATP. Reactions were initiated with the addition of the PKC/Myelin Basic Protein working solution and mixing. Reactions were incubated at 30°C for 20 min. The reactions were stopped by adding 50 Tl of 100 mM EDTA and 100 mM sodium

pyrophosphate and mixing. Phosphorylated Myelin Basic Protein was collected on PVDF membranes in 96 well filter plates and quantitated by scintillation counting.

Compounds of the instant invention described in the Schemes and Tables were tested in the assay described above and were found to have IC_{50} of $\leq 50 \mu M$ against one or more of Akt1, Akt2 and Akt3.

EXAMPLE 5

Cell based Assays to Determine Inhibition of Akt/PKB

Cells (for example LnCaP or a PTEN^(-/-) tumor cell line with activated Akt/PKB) were plated in 100 mM dishes. When the cells were approximately 70 to 80% confluent, the cells were refed with 5 mls of fresh media and the test compound added in solution. Controls included untreated cells, vehicle treated cells and cells treated with either LY294002 (Sigma) or wortmanin (Sigma) at 20 μM or 200 nM, respectively. The cells were incubated for 2, 4 or 6 hrs, and the media removed, the cells were washed with PBS, scraped and transferred to a centrifuge tube. They were pelleted and washed again with PBS. Finally, the cell pellet was resuspended in lysis buffer (20 mM Tris pH8, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM Na Pyrophosphate, 10 mM β -Glycerol Phosphate, 10 mM NaF, 0.5 mM NaVO₄, 1 μM Microcystine, and 1x Protease Inhibitor Cocktail), placed on ice for 15 minutes and gently vortexed to lyse the cells. The lysate was spun in a Beckman tabletop ultra centrifuge at 100,000 x g at 4°C for 20min. The supernatant protein was quantitated by a standard Bradford protocol (BioRad) and stored at -70°C until needed.

Proteins were immunoprecipitated (IP) from cleared lysates as follows: For Akt1/PKB α , lysates are mixed with Santa Cruz sc-7126 (D-17) in NETN (100mM NaCl, 20mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, 0.5% NP-40) and Protein A/G Agarose (Santa Cruz sc-2003) was added. For Akt2/PKB β , lysates were mixed in NETN with anti-Akt2 agarose (Upstate Biotechnology #16-174) and for Akt3/PKB γ , lysates were mixed in NETN with anti-Akt3 agarose (Upstate Biotechnology #16-175). The IPs were incubated overnight at 4°C, washed and separated by SDS-PAGE.

Western blots were used to analyze total Akt, pThr308 Akt1, pSer473 Akt1, and corresponding phosphorylation sites on Akt2 and Akt3, and downstream targets of Akt using specific antibodies (Cell Signaling Technology): Anti-Total Akt (cat. no. 9272), Anti-Phospho Akt Serine 473 (cat. no. 9271), and Anti-Phospho Akt Threonine 308 (cat. no. 9275). After incubating with the appropriate primary antibody diluted in PBS + 0.5% non-fat dry milk (NFDM) at 4 °C overnight, blots were washed, incubated with Horseradish peroxidase (HRP)-tagged secondary antibody in PBS + 0.5% NFDM for 1 hour at room temperature. Proteins were detected with ECL Reagents (Amersham/Pharmacia Biotech RPN2134).

EXAMPLE 6

Heregulin Stimulated Akt Activation

MCF7 cells (a human breast cancer line that is PTEN^{+/+}) were plated at 1x10⁶ cells per 100mM plate. When the cells were 70 – 80% confluent, they were refed with 5 ml of serum free media and incubated overnight. The following morning, compound was added and the cells were incubated for 1 – 2 hrs, after which time heregulin was added (to induce the activation of Akt) for 30 minutes and the cells were analyzed as described above.

EXAMPLE 7

Inhibition Of Tumor Growth

In vivo efficacy of an inhibitor of the growth of cancer cells may be confirmed by several protocols well known in the art.

Human tumor cell lines which exhibit a deregulation of the PI3K pathway (such as LnCaP, PC3, C33a, OVCAR-3, MDA-MB-468, A2780 or the like) are injected subcutaneously into the left flank of 6-10 week old female nude (also male mice [age 10-14 weeks] are used for prostate tumor xenografts [LnCaP and PC3]) mice (Harlan) on day 0. The mice are randomly assigned to a vehicle, compound or combination treatment group. Daily subcutaneous administration begins on day 1 and continues for the duration of the experiment. Alternatively, the inhibitor test compound may be administered by a continuous infusion pump. Compound, compound combination or vehicle is delivered in a total volume of 0.2 ml. Tumors are excised and weighed when all of the vehicle-treated animals exhibited lesions of 0.5 - 1.0 cm in diameter, typically 4 to 5.5 weeks after the cells were injected. The average weight of the tumors in each treatment group for each cell line is calculated.

EXAMPLE 8

Spot Multiplex Assay

This procedure describes a sandwich immunoassay used to detect multiple phosphorylated proteins in the same well of a 96 well format plate. Cell lysates are incubated in 96-well plates on which different capture antibodies are placed on spatially distinct spots in the same well. Phosphorylation-specific rabbit polyclonal antibodies are added and the complex is detected by an anti-rabbit antibody labeled with an electrochemiluminescent tag.

96-Well LNCaP plates +/- Compounds:

Spin in Beckman J6 1200 rpm 10 min, aspirate media. Add 50µl/well: TBS (Pierce #28376-20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl) + 1% Triton X-100 + Protease and Phosphatase Inhibitors. Wrap in plastic wrap, place in -70°C freezer until completely frozen. Block Multiplex Plates (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) with 3% Blocker A in 1X Tris Wash Buffer, 150µl/well. Cover with plate sealer, incubate on Micromix shaker RT 2h (minimum). Wash with 1X RCM 51 (TTBS). Thaw cell lysate plates on ice, add 40µl lysate/well into blocked plates. Cover with plate sealer, incubate on Micromix shaker 4°C O/N, Wash with 1X RCM 51. Dilute Secondary Antibodies in 1% Blocker A in 1X Tris Wash Buffer: Anti phospho AKT (T308), Anti phospho Tuberin (T1462), alone or in combination. Add 25µl/well, cover with plate sealer, incubate on Micromix shaker RT 3h. Wash with 1X RCM 51.

Dilute Ru-GAR in 1% Blocker A in 1X Tris Wash Buffer. Add 25µl/well, cover with plate sealer, incubate on Micromix shaker RT 1h. Wash with 1X RCM 51. Dilute 4X Read Buffer T to 1X with Water, add 200µl diluted Read Buffer/well
Read on Sector 6000 Imager.

5 Protease and Phosphatase Inhibitors:

Microcystin-LR, Calbiochem # 475815 to 1 µM final concentration (stock=500µM)

Calbiochem # 524624, 100X Set I

Calbiochem # 524625, 100X Set II

Calbiochem # 539134, 100X Set III

10 Anti Phospho AKT (T308):

Cell Signaling Technologies # 9275

Anti Phospho Tuberin (T1462):

Covance Affinity Purified (Rabbits MS 2731/2732)

Ru-GAR = Ruthenylated Goat anti Rabbit

15 10X Tris Wash Buffer, Blocker A and 4X Read Buffer T

10X RCM 51 (10X TTBS, RCM 51)

1X = 20mM Tris pH 7.5, 140mM NaCl, 0.1% Tween-20

EXAMPLE 9

Cell-Based (In-vivo) Assay

- 20 This procedure describes a cell-based (in vivo) activity assay for the Akt serine/threonine kinase. Activated endogenous Akt is capable of phosphorylating a specific Akt substrate (GSK3β) peptide which is biotinylated. Detection is performed by Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF) using a Europium Kryptate [Eu(K)] coupled antibody specific for the phosphopeptide and streptavidin linked XL665 fluorophore which will bind to the biotin moiety on the peptide. When the [Eu(K)] and XL665 are in proximity (i.e. bound to the same phosphopeptide molecule) a non-radiative energy transfer takes place from the Eu(K) to the XL665, followed by emission of light from XL665 at 665 nm.
- 25

The assay can be used to detect inhibitors of all three Akt isozymes (Akt1, Akt2, and Akt3) from multiple different species if specific antibodies to each exist.

30 MATERIALS AND REAGENTS

- A. Cell Culture Microtiter Flat Bottom 96 well plates, Corning Costar, Catalog no. 3598
- B. Reacti-Bind Protein A Coated 96-well plates, Pierce, Catalog no 15130.
- C. Reacti-Bind Protein G Coated 96-well plates, Pierce, Catalog no 15131.
- D. Micromix 5 Shaker.
- 35 E. Microfluor®B U Bottom Microtiter Plates, Dynex Technologies, Catalog no. 7205.
- F. 96 Well Plate Washer, Bio-Tek Instruments, Catalog no. EL 404.
- G. Discovery® HTRF Microplate Analyzer, Packard Instrument Company.

BUFFER SOLUTIONS

- A. IP Kinase Cell Lysis Buffer: 1X TBS; 0.2% Tween 20; 1X Protease Inhibitor Cocktail III (Stock is 100X, Calbiochem, 539134); 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail I (Stock is 100X, Calbiochem, 524624); and 1X Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Stock is 100X, Calbiochem, 524625).
- 5 B. 10X Assay Buffer: 500 mM Hepes pH 7.5; 1% PEG; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; and 20 mM β -glycerophosphate.
- C. IP Kinase Assay Buffer: 1X Assay Buffer; 50 mM KCl; 150 μ M ATP; 10 mM $MgCl_2$; 5% Glycerol; 1 mM DTT; 1 Tablet Protease Inhibitor Cocktail per 50 ml Assay Buffer; and 0.1% BSA
- 10 D. GSK3 β Substrate Solution: IP Kinase Assay Buffer; and 500 nM Biotinylated GSK3 β peptide.
- E. Lance Buffer: 50 mM Hepes pH 7.5; 0.1% BSA; and 0.1% Triton X-100.
- F. Lance Stop Buffer: Lance Buffer; and 33.3 mM EDTA.
- G. Lance Detection Buffer: Lance Buffer; 13.3 μ g/ml SA-APC; and 0.665 nM EuK Ab a-
- 15 phospho (Ser-21) GSK3 β
- Multi-Step Immunoprecipitation Akt Kinase Assay
- Day1
- A. Seed C33a cells Step: Plate 60,000 C33a cells/well in 96 well microtiter plate.
- B. Incubate cells overnight at 37°C.
- 20 Day 2
- D. Compound Addition Step: Add compounds in fresh media (alpha-MEM/10% FBS, room temp) to 96 well plate from above and incubate for 5 hrs in tissue culture incubator.
- E. Cell Lysis Step: Aspirate media and add 100 μ l of IP Kinase Cell Lysis Buffer.
- F. Freeze 96 well microtiter plate at -70°C (NOTE: This step can be done for a minimum of 1
- 25 hour or overnight.)
- Day 3
- G. Coat Protein A/G 96 well plate Step: Add appropriate concentration of α -Akt antibody (Akt1, Akt2, or Akt3) in a 100 μ l of PBS to the following wells:
- | | | |
|----|------------------------------------|--|
| | α -Akt 1 (20 ng/well/100ul) | B2 >>>>>> B10 / rows B – G / Akt1 plate |
| 30 | α -Akt 2 (50 ng/well/100ul) | B2 >>>>>> B10 / rows B – G / Akt2 plate |
| | Rabbit-IgG (150 ng/well/100 ul): | B11 – G11 on every plate (Akt1 and Akt2) |
- H. Incubate in the cold room (+4°C) for 4 hours on the Micromix 5 (Form 20; Attitude 2) (NOTE: Attitude depends on which Micromix 5 machine).
- I. Aspirate off α -Akt antibody solution and add 100 μ l of PBS to each well.
- 35 J. Akt Immunoprecipitation Step: To the 100 μ l of PBS from Step(I) add 5 μ l of thawed cell lysate for Akt1 plates and 10 μ l of thawed cell lysate for Akt2 plates. NOTE: Thaw cell lysate on ice. Mix thawed lysate by pipetting up & down 10X before transferring to antibody plates.

5

Keep the cell lysate plates on ice. After transfer of cell lysate to the antibody plates refreeze the cell lysate plates at -70°C .

K. Incubate in the cold room ($+4^{\circ}\text{C}$) overnight on Micromix 5 shaker (form 20, attitude 3).

Day 4

- 5 L. Immunoprecipitation Plate Wash Step: Wash 96 well plates 1X with TTBS (RCM 51, 1X = 2 cycles) using the 96-Well Plate Washer. Fill wells with TTBS and incubate for 10 minutes. Wash 96 well plates 2X with TTBS. (NOTE: Prime plate washer before use: 1. Check buffer reservoirs, making sure they are full and 2. empty waste containers.

M. Manual Plate Wash Step: Add 180 μl of IP Kinase Assay buffer.

- 10 N. Start Akt Enzyme Reaction: Aspirate supernatant. Add 60 μl of GSK3 β Substrate Solution.
O. Incubate for 2.5 hours on Micromix 5 shaker @ RT. NOTE: Time of incubation should be adjusted so that the ratio of Column 10 /Column 11 is not >10 .

P. Combine 30 μl of Lance Detection Buffer with 30 μl of Lance Stop Buffer (60 μl total/well) and add to Microfluor U bottom 96 well black plates.

- 15 Q. Stop Akt Enzyme Reaction: Transfer 40 μl of Akt Enzyme Reaction Mix from Protein A/G 96 well plate from Step (O) to Microfluor U bottom 96 well black plates from Step (P).

U. Incubate at room temperature for 1-2 hrs on Micromix 5 shaker (form 20, attitude 3), then read with the Discovery HTRF Microplate Analyzer using Akt program.

IP Kinase Cell Lysis Buffer

- 20 100 μl per well

	8 ml (1 Plate)		45 ml (6 Plates)
1X TBS	7744 μl		NA
Tween 20	20 μl		NA
1X Protease Inhibitor Cocktail III	80 μl		NA
1X Phosphatase Inhibitor Cocktail			450 μl
I	80 μl		450 μl
1X Phosphatase Inhibitor Cocktail			450 μl
II	80 μl		
Microcystin LR (500X)			90 μl

IP Kinase Assay Buffer

100 μl per well

	8 ml (1 Plate)		50 ml (3 Plates)
--	-------------------	--	---------------------

56

10X Assay Buffer	800 μ l		5 ml
1 M KCl	400 μ l		2.5 ml
250 mM ATP	4.8 μ l		30 μ l
1M MgCl ₂	80 μ l		500 μ l
Glycerol	400 μ l		2.5 ml
1M DTT	8 μ l		50 μ l
Protease Inhibitor Cocktail	1 tablet/50 ml		1
10% BSA	80 μ l		500 μ l
di dH ₂ O	6227.2 μ l		38.9 ml

GSK3 β Substrate Solution60 μ l per well

	5 ml (1 Plate)		7 ml
IP Kinase Assay Buffer	5 ml		-
1 mM GSK3 β peptide	2.5 μ l		3.5 μ l

Lance Stop Buffer30 μ l per well

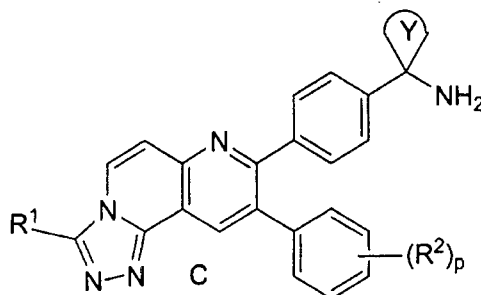
	3 ml (1 Plate)	5 ml	5 ml
1X Lance Buffer	2800.2 μ l		
EDTA 0.5 M	199.8 μ l		

5 Lance Detection Buffer30 μ l per well

	3 ml (1 Plate)		5 ml
SA-APC (1 mg/ml in ddH ₂ O, dilute 1/75.2 in Lance Buffer)	40 μ l		66.7 μ l
EuK Ab α -phospho (Ser 21)GSK3 β (680 nM, dilute 1/1133 in Lance Buffer)	2.7 μ l		4.5 μ l

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A compound according to Formula C:



5 wherein:

a is 0 or 1; b is 0 or 1; m is 0, 1 or 2; p is 0, 1 or 2;

R² is independently selected from: (C₁-C₆)alkyl, (C₁-C₆)alkoxy, CO₂H, halo, OH and NH₂;

10

Ring Y is (C₄-C₇)cycloalkyl;

R¹ is selected from: H, oxo, (C=O)_aO_b(C₁-C₁₀)alkyl, (C=O)_aO_b-aryl, (C=O)_aO_b(C₂-C₁₀)alkenyl, (C=O)_aO_b(C₂-C₁₀)alkynyl, CO₂H, halo, OH, O_b(C₁-C₆)perfluoroalkyl, (C=O)_aNR⁷R⁸, CN, (C=O)_aO_b(C₃-C₈)cycloalkyl, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-(C₁-C₁₀)alkyl and (C=O)_aO_b-heterocyclyl, said alkyl, aryl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, and heterocyclyl is optionally substituted with one or more substituents selected from R⁶;

15

R⁶ is: (C=O)_aO_bC₁-C₁₀ alkyl, (C=O)_aO_baryl, C₂-C₁₀ alkenyl, C₂-C₁₀ alkynyl, (C=O)_aO_b heterocyclyl, CO₂H, halo, CN, OH, O_bC₁-C₆ perfluoroalkyl, O_a(C=O)_bNR⁷R⁸, oxo, CHO, (N=O)R⁷R⁸, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-(C₁-C₁₀)alkyl or (C=O)_aO_bC₃-C₈ cycloalkyl, said alkyl, aryl, alkenyl, alkynyl, heterocyclyl, and cycloalkyl optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a};

20

R^{6a} is selected from: (C=O)_aO_b(C₁-C₁₀)alkyl, O_a(C₁-C₃)perfluoroalkyl, (C₀-C₆)alkylene-S(O)_mR^a, SH, oxo, OH, halo, CN, (C₂-C₁₀)alkenyl, (C₂-C₁₀)alkynyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, (C₀-C₆)alkylene-aryl, (C₀-C₆)alkylene-heterocyclyl, (C₀-C₆)alkylene-N(R^b)₂, C(O)R^a, (C₀-C₆)alkylene-CO₂R^a, C(O)H, and (C₀-C₆)alkylene-CO₂H, said alkyl, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, aryl, and heterocyclyl is optionally substituted with up to three substituents selected from R^b, OH, (C₁-C₆)alkoxy, halogen, CO₂H, CN, O_a(C=O)_b(C₁-C₆)alkyl, oxo, and N(R^b)₂;

25

30

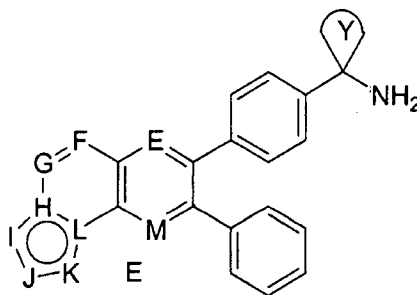
R⁷ and R⁸ are independently selected from: H, (C=O)_aO_b(C₁-C₁₀)alkyl, (C=O)_aO_b(C₃-C₈)cycloalkyl, (C=O)_aO_b-aryl, (C=O)_aO_b-heterocyclyl, (C₂-C₁₀)alkenyl, (C₂-C₁₀)alkynyl, SH, SO₂R^a, and (C=O)_aNR^b₂, said alkyl, cycloalkyl, aryl, heterocyclyl, alkenyl, and alkynyl is optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a}, or R⁷ and R⁸ can be taken together with the nitrogen to which they are attached to form a monocyclic or bicyclic heterocycle with 3-7 members in each ring and optionally containing, in addition to the nitrogen, one or two additional heteroatoms selected from N, O and S, said monocyclic or bicyclic heterocycle optionally substituted with one or more substituents selected from R^{6a};

R^a is (C₁-C₆)alkyl, (C₃-C₆)cycloalkyl, aryl, or heterocyclyl; and

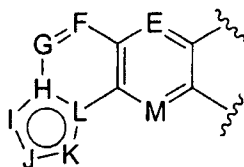
R^b is independently: H or (C₁-C₆)alkyl;

or a pharmaceutically acceptable salt or a stereoisomer thereof.

2. A compound according to Formula E:

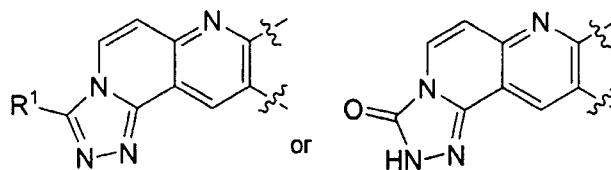


wherein:



is

61



Ring Y is cyclobutyl;

5 R¹ is H, pyrimidyl, methylimidazole, OH, methyl or cyclopropyl;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. A compound which is:

10

1-{4-[3-(1-methyl-1*H*-imidazol-4-yl)-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl]phenyl}cyclobutanamine dihydrochloride;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15

4. A compound which is:

tert-butyl {1-[4-(9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutyl} carbamate;

20

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5. A compound which is:

25 1-[4-(9-phenyl-3-pyrimidin-2-yl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]cyclobutanamine;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

30

6. A compound which is:

8-[4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl]-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naphthyridin-3(2*H*)-one;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

35



7. A compound which is:

1-[4-(3-methyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl] cyclobutanamine;

5 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

8. A compound which is:

10 1-[4-(3-cyclopropyl-9-phenyl[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naphthyridin-8-yl)phenyl]
cyclobutanamine;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15 9. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutical
carrier, and dispersed therein, a therapeutically effective amount of a compound of Claim 1.

10. The use of the compound according to Claim 1 for the preparation of a
medicament useful in the treatment or prevention of cancer in a mammal in need of such
treatment.

TÍTULO DE LA INVENCION

INHIBIDORES DE LA ACTIVIDAD DE LA AKT

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a compuestos de naftiridina sustituidos que son inhibidores de la actividad de una o más de las isoformas de la serie serina / treonina quinasa, Akt (también conocida como PKB; de aquí en adelante denominada en el presente documento “Akt”). La presente invención también se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden tales compuestos y los procedimientos de uso de los presentes compuestos en el

10 tratamiento de cáncer.

La apoptosis (muerte celular programada) juega papeles esenciales en el desarrollo embrionario y patogénesis de diversas enfermedades, tales como enfermedades degenerativas neuronales, enfermedades cardiovasculares y cáncer. Un trabajo reciente ha llevado a la identificación de diversos productos génicos pro- y anti - apoptóticos que están

15 implicados en la regulación o ejecución de muerte celular programada. La expresión de genes antiapoptóticos, tales como Bcl2 o Bcl-x_L, inhibe la muerte celular apoptótica inducida por diversos estímulos. Por otra parte, la expresión de genes apoptóticos, tales como bax o bad, conduce a la muerte celular programada Adams et al. *Science*, 281: 1322 - 1326 (1998)). La ejecución de la muerte celular programada está mediada por la las proteinasas relacionadas con la

20 caspasa - 1, incluyendo la caspasa - 3, caspasa - 7, caspasa - 8 y caspasa - 9 etc (Thornberry et al. *Science*, 281: 1312 - 1316 (1998)).

La ruta de fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3K)/Akt parece importante para regular la supervivencia celular / muerte celular (Kulik et al. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595 - 1606 (1997); Franke et al, *Cell*, 88: 435 - 437 (1997); Kauffmann-Zeh et al. *Nature* 385: 544 - 548

25 (1997) Hemmings *Science*, 275: 628 - 630 (1997); Dudek et al., *Science*, 275: 661 - 665 (1997)). Los factores de supervivencia, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento nervioso (NGF) y factor - 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1), promueve la supervivencia celular en diversas condiciones induciendo la actividad de PI3K (Kulik et al. 1997, Hemmings 1997). La PI3K activada conduce a la

30 producción de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PtdIns(3,4,5)-P3), que a su vez se une a, y promueve la activación de, la serina / treonina quinasa Akt, que contiene un dominio de homología con pleckstrina (PH) (Franke et al *Cell*, 81: 727 - 736 (1995); Hemmings *Science*, 277: 534 (1997); Downward, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:262-267 (1998), Alessi et al., *EMBO J.* 15: 6541 - 6551 (1996)). Los inhibidores específicos de PI3K o mutantes de Akt dominantes

35 negativos suprimen las actividades que promueven la supervivencia de estos factores de crecimiento o citoquinas. Se ha descrito previamente que los inhibidores de PI3K (LY294002 o wortmannina) bloquean la activación de Akt por las quinasas cadena abajo. Además, la introducción de PI3K constitutivamente activa o mutantes de Akt promueve la supervivencia de

de células en condiciones en las que las células normalmente experimentan muerte celular apoptótica (Kulik et al. 1997, Dudek et al. 1997).

Tres miembros de la subfamilia Akt de las serina / treonina quinasas reguladas por un segundo mensajero se han identificado y se denominan Akt1/ PKB α , Akt2/PKB β , y Akt3/PKB γ (de aquí en adelante denominadas en el presente documento "Akt1", "Akt2" y "Akt3"), respectivamente. Las isoformas son homólogas, particularmente en las regiones que codifican los dominios catalíticos. Akts están activadas por los episodios de fosforilación que se producen en respuesta a la señalización de PI3K. PI3K fosforila los fosfolípidos de inositol de membrana, que generan los segundos mensajeros fosfatidil-inositol 3,4,5-trisfosfato y fosfatidil-inositol 3,4-bisfosfato, que se ha mostrado que se unen al dominio PH de Akt. El modelo actual de la activación de Akt proporciona el reclutamiento de la enzima a la membrana por fosfoinosítidos 3'-fosforilados, donde se produce la fosforilación de los sitios reguladores de Akt por las quinasas cadena arriba (B.A. Hemmings, *Science* 275: 628 - 630 (1997); B.A. Hemmings, *Science* 276: 534 (1997); J. Downward, *Science* 279: 673 - 674 (1998)).

La fosforilación de Akt1 se produce en dos sitios reguladores, Thr³⁰⁸ en el bucle de activación del dominio catalítico y sobre Ser⁴⁷³ cerca del extremo carboxi (D. R. Alessi et al. *EMBO J.* 15: 6541 - 6551 (1996) y R. Meier et al. *J. Biol. Chem.* 272: 3049 - 30497 (1997)). Los sitios de fosforilación reguladores equivalentes se producen en Akt2 y Akt3. La quinasa cadena arriba, que fosforila Akt en el sitio del bucle de activación se ha clonado y se denomina proteína quinasa 1 (PDK1) dependiente de 3'-fosfoinosítido. La PDK1 no fosforila solamente Akt, sino también S6 quinasa ribosómica p70, p90RSK, suero y quinasa regulada por glucocorticoides (SGK), y la proteína quinasa C. La quinasa cadena arriba que fosforila el sitio regulador de Akt cerca del extremo carboxi no se ha identificado todavía, pero reseñas recientes suponen un papel para la quinasa unida a integrina (ILK-1), a serina/treonina proteína quinasa, o autofosforilación.

Los análisis de los niveles de Akt en tumores humanos mostró que Akt2 se sobreexpresa en un número significativo de cánceres de ovario (J. Q. Cheng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9267 - 9271 (1992)) y de páncreas (J. Q. Cheng et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 3636 - 3641 (1996)). De manera similar, Akt3 se encontró que se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Nakatani et al. *J. Biol. Chem.* 274: 21528 - 21532 (1999)).

El PTEN supresor de tumores, una fosfatasa de proteína y lípidos que elimina específicamente el 3' fosfato de PtdIns (3,4,5)-P3, es un regulador negativo de la ruta PI3K/Akt (Li et al. *Science* 275: 1943 - 1947 (1997), Stambolic et al. *Cell* 95: 29 - 39 (1998), Sun et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 6199 - 6204 (1999)). Las mutaciones de la línea germinal de PTEN son responsables de síndromes de cánceres humanos tales como enfermedad de Cowden (Liaw et al. *Nature Genetics* 16: 64 - 67 (1997)). PTEN se suprime en un gran porcentaje de tumores humanos y las líneas de células de tumores sin PTEN funcional muestran niveles



elevados de Akt activada (Li et al. supra, Guldberg et al. *Cancer Research* 57: 3660 - 3663 (1997), Risinger et al. *Cancer Research* 57: 4736 - 4738 (1997)).

Estas observaciones demuestran que la vía PI3K/Akt juega papeles importantes para regular la supervivencia de células o apoptosis en la tomorigéensis.

5 La inhibición de la activación y actividad de Akt se puede lograr mediante la inhibición de PI3K con los inhibidores tales como LY294002 y wortmannina. Sin embargo, la inhibición de PI3K tiene el potencial de afectar indiscriminadamente no solo las tres isozimas de Akt sino también otras moléculas de señalización que contienen el dominio PH que son dependientes de PdtIns(3,4,5)-P3, tal como la familia Tec de las tirosina quinasas. Además, se
10 ha descrito que la Akt puede estar activada por las señales de crecimiento que son independientes de PI3K.

De manera alternativa, la actividad de Akt se puede inhibir mediante el bloqueo de la actividad de la quinasa PDK1 cadena arriba. Se han descrito los inhibidores no específicos de la PDK1. De nuevo, la inhibición de la f PDK1 daría como resultado la inhibición de de las
15 proteína quinasas múltiples cuyas actividades dependen de la PDK1, tales como las isoformas de PKC, SGK, y S6 quinasas (Williams et al. *Curr. Biol.* 10: 439 - 448 (2000)).

Los compuestos de la presente invención tienen propiedades inesperadamente ventajosas sobre los compuestos de naftiridina ciclopropil sustituidos descritos específicamente en el documento WO 2006/135627.

20 Un objeto de la presente invención es proporcionar compuestos novedosos que son inhibidores de la Akt.

También es un objeto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos novedosos que son inhibidores de la Akt.

25 También es un objeto de la presente invención es proporcionar cun procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende la administración de tales inhibidores de la actividad de Akt.

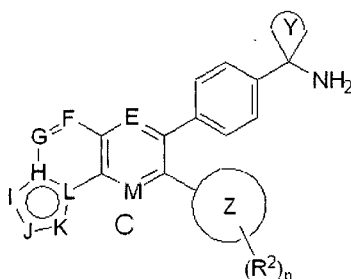
SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona compuestos de naftiridina sustituidos que inhiben la actividad de Akt. En particular, los compuestos descritos de manera selectiva inhiben una o dos de las isoformas de Akt. La invención también proporciona composiciones que comprenden tales compuestos inhibidores y procedimientos de inhibición de la actividad de Akt
35 actividad mediante la administración del compuesto a un paciente en necesidad del mismo de cáncer.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Los compuestos de la presente invención son útiles en la inhibición de la actividad de la serina/treonina quinasa Akt.

En una realización de esta invención, los inhibidores de la actividad de Akt se ilustran mediante la fórmula C:



5

en la que:

a es 0 ó 1; b es 0 ó 1; m es 0, 1 ó 2; p es 0, 1 ó 2;

R² se selecciona independientemente entre: alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), CO₂H, halo, OH y NH₂;

10

El anillo Y es cicloalquilo (C₄-C₇);

R¹ se selecciona entre: H, oxo, (C=O)_aO_balquilo (C₁-C₁₀), (C=O)_aO_b-arilo, (C=O)_aO_b alqueno (C₂-C₁₀), (C=O)_aO_b alquino (C₂-C₁₀), CO₂H, halo, OH, O_b perfluoroalquilo (C₁-C₆), (C=O)_aNR⁷R⁸, CN, (C=O)_aO_b cicloalquilo (C₃-C₈), S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-alquilo (C₁-C₁₀) y (C=O)_aO_b-heterociclilo, dicho alquilo, arilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, y heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R⁶;

15

R⁶ es: (C=O)_aO_b alquilo C₁-C₁₀, (C=O)_aO_barilo, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, (C=O)_aO_b heterociclilo, CO₂H, halo, CN, OH, O_b perfluoroalquilo C₁-C₆, O_a(C=O)_bNR⁷R⁸, oxo, CHO, (N=O)R⁷R⁸, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m- alquilo (C₁-C₁₀) o (C=O)_aO_b cicloalquilo C₃-C₈, dicho alquilo, arilo, alqueno, alquino, heterociclilo, y cicloalquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a};

20

R^{6a} se selecciona entre: (C=O)_aO_b alquilo (C₁-C₁₀), O_a perfluoroalquilo (C₁-C₃), alqueno (C₀-C₆) -S(O)_mR^a, SH, oxo, OH, halo, CN, alqueno (C₂-C₁₀), alquino (C₂-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), alqueno (C₀-C₆) -arilo, alqueno (C₀-C₆) -heterociclilo, alquilen (C₀-C₆) -N(R^b)₂, C(O)R^a, alquilen (C₀-C₆) -CO₂R^a, C(O)H, y alquilen (C₀-C₆) -CO₂H, dicho alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, y heterociclilo está opcionalmente sustituido con up to tres sustituyentes seleccionados entre R^b, OH, alcoxi (C₁-C₆), halógeno, CO₂H, CN, O_a(C=O)_b alquilo (C₁-C₆), oxo, y N(R^b)₂;

25

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre: H, (C=O)_aO_b alquilo (C₁-C₁₀), (C=O)_aO_b cicloalquilo (C₃-C₈), (C=O)_aO_b-arilo, (C=O)_aO_b-heterociclilo, alqueno (C₂-C₁₀), alquino (C₂-C₁₀), SH, SO₂R^a, y (C=O)_aNR^b₂, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo,

30

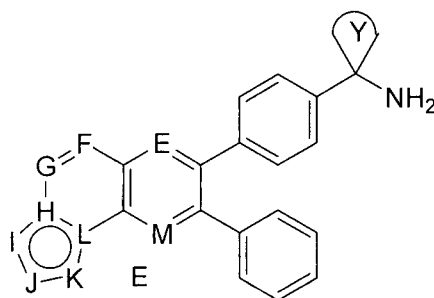
heterociclilo, alquenilo, y alquinilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a} , o R^7 y R^8 se pueden tomar juntos con el nitrógeno al que están unidos para formar a heterociclo monocíclico o bicíclico con 3 - 7 miembros en cada anillo conteniendo opcionalmente, además del nitrógeno, uno o dos heteroátomos adicionales seleccionados entre N, O y S, dicho heterociclo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a} ;

R^a es alquilo (C1-C6), cicloalquilo (C3-C6), arilo, o heterociclilo; y

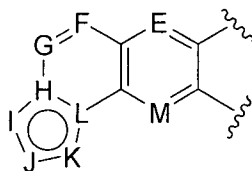
R^b es independientemente: H, alquilo (C1-C6), arilo, heterociclilo, cicloalquilo (C3-C6), $(C=O)_aO_b$ alquilo (C1-C6), o $S(O)_mR^a$;

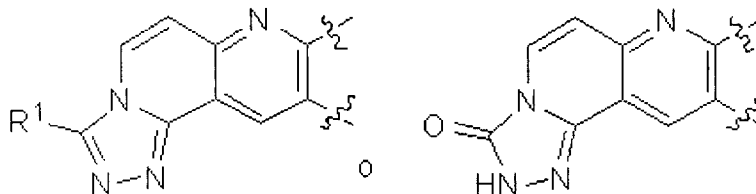
o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización de esta invención, los inhibidores de la actividad de Akt se ilustran por la fórmula E:



en la que:





el anillo Y es ciclobutilo;

R¹ es H, pirimidilo, metilimidazol, OH, metilo o ciclopropilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 Un compuesto de la presente invención es:

Diclorhidrato de 1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutanamina (**1-9**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la presente invención es:

10 1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de terc-butilo (**1-15**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la presente invención es:

15 1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-10**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la presente invención es:

20 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-3-ona (**1-16**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la presente invención es:

25 1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-17**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Un compuesto de la presente invención es:

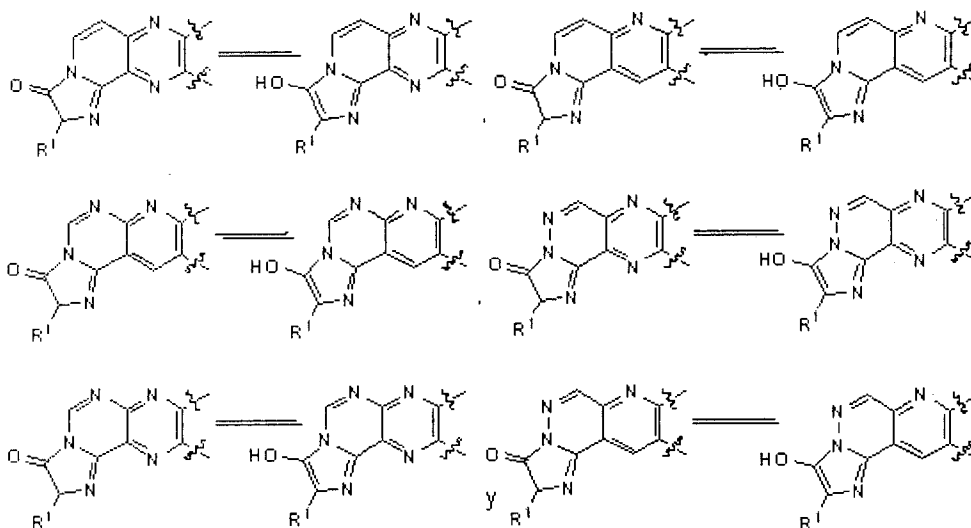
30 1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-23**);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



Los compuestos de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales, y planos quirales (como se describe en: E.L. Eliel y S.H. Wilen, *Stereochemistry of Carbon Compounds*, John Wiley & Sons, New York, 1994, páginas 1119 - 1190), y aparecen como racematos, mezclas racémicas, y como diastereómeros individuales, con todos los posibles isómeros y las mezclas de los mismos, incluyendo isómeros ópticos, estando incluidos todos estos estereoisómeros en la presente invención.

Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden existir como tautómeros y ambas formas tautómeras se pretenden que estén abarcados por el alcance de la invención, incluso aunque se describe solamente una estructura tautómera. Por ejemplo los siguientes están dentro de la presente invención:



Los tetrazoles existen como una mezcla de tautómeros 1H/2H. Las formas tautómeras del resto tetrazol también están dentro del alcance de la presente invención.

Esta invención también pretende abarcar los profármacos de los compuestos descritos en el presente documento. Un profármaco de cualquiera de los compuestos se puede preparar usando técnicas farmacológicas bien conocidas.

Cuando cualquier variable (por ejemplo, R², etc.) aparece más de una vez en cualquier constituyente, su definición cada vez que aparece es independiente de cada otra aparición. También, las combinaciones de sustituyentes y variables son permisibles solamente si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables. Las líneas dibujadas en los sistemas de anillo de los sustituyentes representan que el enlace indicado puede estar unido a cualquiera de los átomos en el anillo sustituibles. Si el sistema de anillo es bicíclico, se pretende que el enlace esté unido a cualquiera sobre cualquier anillo del resto bicíclico.

Se entiende que uno o más átomos de silicio (Si) puede estar incorporado en los compuestos de la presente invención en lugar de uno o más átomos de carbono por los expertos en la técnica para proporcionar los compuestos que son químicamente estables y que se pueden

sintetizar fácilmente mediante técnicas conocidas en la técnica a partir de materiales de partida disponibles. El carbono y silicio difieren en un radio covalente que conduce a diferencias en la distancia de enlace y la disposición estérica cuando se comparan enlaces análogos del elemento C y elemento Si. Estas diferencias conducen a cambios adecuados en el tamaño y forma de los compuestos que contienen silicio cuando se compara a carbono. Los expertos en la técnica entenderían que las diferencias en tamaño y forma pueden conducir a cambios sutiles o drásticos en potencia, solubilidad, carencia de la actividad diana, propiedades de envasado, y así (Dias, J. O. *et al.* *Organometallics* (2006) 5: 1188 - 1198; Showell, G.A. *et al.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (2006) 16: 2555 - 2558).

Se entiende que los sustituyentes y patrones de sustitución sobre los compuestos de la presente invención se pueden seleccionar por los expertos en la técnica para proporcionar compuestos que son químicamente estables y que se pueden sintetizar fácilmente mediante técnicas bien conocidas en la técnica, así como los procedimientos establecidos más adelante, a partir de materiales de partida disponibles. Si un sustituyente se sustituye él mismo con más de un grupo, se entiende que estos múltiples grupos pueden estar sobre el mismo carbono o sobre diferentes carbonos, mientras se produce una estructura estable. La frase “opcionalmente sustituida con uno o más sustituyentes” se debe considerar que es equivalente a la frase “opcionalmente sustituido con al menos un sustituyente” y en tales casos la realización preferida tendrá entre cero y cuatro sustituyentes, y la realización más preferida tendrá entre cero y tres sustituyentes.

Como se usa en el presente documento, “alquilo” se pretende que incluya grupos hidrocarburos alifáticos saturados ramificados y de cadena lineal que tienen el número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, C₁-C₁₀, como en “alquilo (C₁-C₁₀)” se define que incluyan grupos que tienen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 carbonos en una disposición lineal o ramificada. Por ejemplo, “alquilo (C₁-C₁₀)” específicamente incluye metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilol, *n*-butilo, *t*-butilo, *i*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilol, y así sucesivamente.

El término “cicloalquilo” significa un grupo hidrocarburo alifático saturado monocíclico que tiene el número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, “cicloalquilo” incluye ciclopropilo metil-ciclopropilo 2,2-dimetil-ciclobutilo, 2-etil-ciclopentilo, ciclohexilo, y así sucesivamente.

“Alcoxi” representa un grupo alquilo o bien cíclico o no cíclico del número indicado de átomos de carbono unidos mediante un puente de oxígeno. “Alcoxi” por lo tanto abarca las definiciones de de alquilo y cicloalquilo anteriores.

Si no se especifica un número de átomos de carbono, el término “alquenilo” se refiere a un radical hidrocarburo no aromático, lineal, ramificado o cíclico, que contiene entre 2 y 10 átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono. Preferiblemente un doble enlace carbono-carbono está presente, y pueden estar presentes hasta cuatro dobles enlaces

carbono carbono. De este modo, "alquenilo (C₂-C₁₀)" significa un radical alquenilo que tiene entre 2 y 10 átomos de carbono. Los grupos alquenilo incluyen etenilo, propenilo, butenilo, 2-metilbutenilo y ciclohexenilo. La parte lineal, ramificada o cíclica del grupo alquenilo puede contener dobles enlaces y puede estar sustituida si se indica un grupo alquenilo sustituido.

5 El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo lineal ramificado o cíclico, que contiene entre 2 y 10 átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono carbono. Pueden estar presentes hasta tres triples enlaces carbono - carbono. De este modo, "alquinilo (C₂-C₁₀)" significa un radical alquinilo que tiene entre 2 y 10 átomos de carbono. Los grupos alquinilo incluyen etinilo, propinilo, butinilo, 3-metilbutinilo y así sucesivamente. La parte lineal, ramificada o cíclica del grupo alquinilo puede contener triples enlaces y puede estar sustituida si se indica un grupo alquinilo sustituido.

10 En ciertos casos, los sustituyentes pueden estar definidos con un intervalo de carbonos que incluye cero, tal como alquilen (C₀-C₆) -arilo. Si se toma arilo para que sea fenilo, esta definición incluiría el propio fenilo así como -CH₂Ph, -CH₂CH₂Ph, 15 CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)Ph, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, "arilo" se pretende que signifique cualquier anillo de carbono monocíclico o bicíclico estable de hasta 7 átomos de carbono en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático. Los ejemplos de tales elementos arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahydro-naphtilo, indanilo y bifenilo. En los casos en los que el sustituyente arilo es bicíclico y un anillo es no aromático, se entiende que la unión es mediante el anillo aromático.

El término heteroarilo, como se usa en el presente documento, representa un anillo monocíclico o bicíclico estable de hasta 7 átomos de carbono en cada anillo, en el que al menos un anillo es aromático y contiene entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por O, N y S. Los grupos heteroarilo dentro del alcance de esta definición incluyen, pero no se limitan a: acridinilo, carbazolilo, cinnolinilo, quinoxalinilo, pirrazolilo, indolilo, benzotriazolilo, furanilo, tienilo, benzotienilo, benzofuranilo, quinolinilo, isoquinolinilo, oxazolilo, isoxazolilo, indolilo, pirazinilo, piridazinilo, piridinilo, pirimidinilo, pirrolilo, tetrahydroquinolina. Como con la definición de heterociclo más adelante, "heteroarilo" también se entiende que incluye el derivado N-óxido de cualquier heteroarilo que contiene nitrógeno. En los casos en los que el sustituyente heteroarilo es bicíclico y un anillo es no aromático o no contiene heteroátomos, se entiende que la unión es mediante el anillo aromático o mediante el anillo que contiene heteroátomos, respectivamente. Tales restos heteroarilo para el sustituyente Q incluyen pero no se limitan a: 2-benzimidazolilo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 4-quinolinilo, 1-isoquinolinilo, 3-isoquinolinilo y 4-isoquinolinilo.

El término "heterociclo" o "heterociclilo" como se usa en el presente documento pretende significar un heterociclo aromático o no aromático de 3- a 10 miembros que contiene entre 1 y 4 heteroátomos seleccionados entre el grupo constituido por O, N y S, e incluye grupos

bicíclicos. "Heterociclilo" por lo tanto incluye los heteroarilos anteriormente mencionados, así como los análogos dihidro y tetrahidro de los mismos. Los ejemplos adicionales de "heterociclilo" incluyen, pero no se limitan a los siguientes: benzoimidazolilo, benzoimidazonilo, benzofuranilo, benzofurazano, benzopirazolilo, benzotriazolilo, benzotiofenilo, benzoxazolilo, carbazolilo, carbolinilo, cinnolinilo, furanilo, imidazolilo, indolinilo, indolilo, indolazino, indazolilo, isobenzofuranilo, isoindolilo, isoquinolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, naftipiridinilo, oxadiazolilo, oxazolilo, oxazolona, isoxazolona, oxetanilo, piranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridopiridinilo, piridazinilo, piridilo, pirimidilo, pirrolilo, quinazolinilo, quinolilo, quinoxalinilo, tetrahidropirano, tetrazolilo, tetrazolopiridilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, azetidinilo, 1,4-dioxano, hexahidroazepino, piperazino, piperidino, piridin-2-onilo, pirrolidino, morfolino, tiomorfolino, dihidrobenzoimidazolilo, dihidrobenzofuranilo, dihidrobenzotiofenilo, dihidrobenzoxazolilo, dihidrofuranilo, dihidroimidazolilo, dihidroindolilo, dihidroisooxazolilo, dihidroisotiazolilo, dihidrooxadiazolilo, dihidrooxazolilo, dihidropirazinilo, dihidropirazolilo, dihidropiridinilo, dihidropirimidinilo, dihidropirrolilo, dihidroquinolinilo, dihidrotetrazolilo, dihidrotiadiazolilo, dihidrotiazolilo, dihidrothienilo, dihidrotriazolilo, dihidroazetidinilo, metilendioxi-benzoilo, tetrahidrofuranilo, y tetrahidrothienilo, y N-óxidos de los mismos. La unión de un sustituyente heterociclilo se puede producir mediante un átomo de carbono o mediante un heteroátomo.

Como apreciarán los expertos en la técnica "halo" o "halógeno" como se usa en el presente documento pretende incluir cloro (Cl), fluoro (F), bromo (Br) y yodo (I).

En una realización, R^1 se selecciona entre: oxo, NH_2 , OH, SH, O_a alquilo (C_1-C_6), dicho alquilo está opcionalmente sustituido con R^{6a} .

En una realización R^b se selecciona independientemente entre H y alquilo (C_1-C_6).

En una realización de fórmula C, R^1 se selecciona entre: oxo, $(C=O)_aO_b$ alquilo (C_1-C_{10}), $(C=O)_aO_b$ -arilo, $(C=O)_aO_b$ alqueno (C_2-C_{10}), $(C=O)_aO_b$ alquino (C_2-C_{10}), CO_2H , halo, OH, O_b perfluoroalquilo (C_1-C_6), $(C=O)_aNR^7R^8$, CN, $(C=O)_aO_b$ (cicloalquilo (C_3-C_8), $S(O)_2NR^7R^8$, SH, $S(O)_2$ - (alquilo (C_1-C_{10}) y $(C=O)_aO_b$ -heterociclilo, dicho alquilo, arilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, y heterociclilo está opcionalmente sustituido con R^{6a} .

En otra realización de fórmula C, R^1 se selecciona entre: oxo, $(C=O)_aO_b$ alquilo (C_1-C_{10}), CO_2H , halo, OH, CN, alcoxi (C_1-C_6), $S(O)_2NR^7R^8$, SH, $S(O)_2$ - alquilo (C_1-C_{10}), $O(C=O)$ alquilo (C_1-C_6) y $N(R^b)_2$, dicho alquilo está opcionalmente sustituido con R^{6a} .

En otra realización de fórmula C, R^1 se selecciona entre: oxo, NH_2 , OH, SH, O_a alquilo (C_1-C_6), dicho alquilo está opcionalmente sustituido con R^{6a} .

En otra realización de fórmula C, R^2 se selecciona entre: oxo, $(C=O)_aO_b$ alquilo (C_1-C_{10}), CO_2H , halo, OH, CN, alcoxi (C_1-C_6), $O(C=O)$ alquilo (C_1-C_6), alqueno (C_2-C_{10}) y

$N(R^b)_2$, dicho alquilo está opcionalmente sustituido con R^b , OH, alcoxi (C₁-C₆), halógeno, CO₂H, CN, O(C=O) alquilo (C₁-C₆), oxo, y $N(R^b)_2$.

- En otra realización de fórmula C, R^1 se selecciona entre: H, heterociclilo, cicloalquilo (C₃-C₆), OH, alquilo (C₁-C₆), NH alquilo (C₁-C₆), NH-heterociclilo, NH-cicloalquilo, dicho heterociclilo, cicloalquilo y alquilo está opcionalmente sustituido con: halo, alquilo (C₁-C₆), alquilo (C₁-C₆) -NH₂, OH, Oalquilo (C₁-C₆)^b y R^2 se selecciona entre: H y halógeno.

- En otra realización de Fórmula C, el anillo Y es ciclobutilo; R^1 se selecciona entre: H, heterociclilo, cicloalquilo (C₃-C₆), OH, alquilo (C₁-C₆), NH alquilo (C₁-C₆), NH-heterociclilo, NH-cicloalquilo, dicho heterociclilo, cicloalquilo y alquilo está opcionalmente sustituido con: halo, alquilo (C₁-C₆), alquil (C₁-C₆) -NH₂, OH, O alquilo (C₁-C₆) y R^2 es H o F.

- En una realización of Fórmula C, el anillo Y es ciclobutilo; R^1 es: H o alquilo (C₁-C₆); y R^2 is H o F.
- En una realización of Fórmula C, el anillo Y es ciclobutilo; R^1 es: H, o alquilo (C₁-C₆); y R^2 is H o F.

- Incluida en la presente invención está la forma libre de los compuestos de fórmula C y E, así como las sales farmacéuticamente aceptables y estereoisómeros de los mismos.
- Alguno de los compuestos específicos aislados ejemplificados en el presente documento son las sales protonadas de los compuestos amina. El término "forma libre" se refiere a los compuestos amina en la forma no sal. Las sales farmacéuticamente aceptables abarcadas no solamente incluyen las sales aisladas ejemplificadas para los compuestos específicos descritos en el presente documento, sino también las sales farmacéuticamente aceptables típicas de la forma libre de los compuestos de la forma libre de los compuestos de Fórmula C y E. La forma libre de los compuestos de sales específicos descritos se pueden aislar usando técnicas conocidas en al técnica. Por ejemplo, la forma libre se puede regenerar tratando la sal con una solución básica acuosa diluida adecuada tal como NaOH acuoso diluido, carbonato de potasio, amoníaco y bicarbonato de sodio. Las formas libres pueden diferir casi en cierta medida de sus respectivas formas de sal en ciertas propiedades físicas, tales como solubilidad en disolventes polares, pero las sales de ácido y básicas son de otra manera farmacéuticamente equivalentes a sus respectivas formas libres para los propósitos de la invención.

- Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta presente invención se pueden sintetizar a partir de los compuestos de esta invención que contienen un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. En general, las sales de los compuestos básicos se preparan o bien mediante cromatografía de intercambio iónico o mediante reacción de la base libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido inorgánico u orgánico formador de sal deseado en un disolvente adecuado o diversas

combinaciones de disolventes. De manera similar, las sales de los compuestos ácidos se forman mediante reacciones con la base inorgánica u orgánica apropiada.

De este modo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención incluyen las sales no tóxicas convencionales de los compuestos de esta invención como formados haciendo reaccionar un compuesto de la presente invención básico con un ácido inorgánico u orgánico. Por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y los similares, así como las preparadas a partir de tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pantoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluensulfónico, metanosulfónico, etano disulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético (TFA) y similares.

Cuando el compuesto de la presente invención es ácido, "sales farmacéuticamente aceptables" adecuadas se refiere a las sales preparadas a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyendo bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, sodio, cinc y similares. Son particularmente preferidas las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen las aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas, y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaína, cafeína, colina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glutamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina, y similares.

La preparación de las sales farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente y otras sales farmacéuticamente aceptables típicas se describe más completamente por Berg *et al.*, "Pharmaceutical Salts," *J. Pharm. Sci.*, 1977: 66: 1 - 19.

También se observará que los compuestos de la presente invención son potencialmente sales internas o bipolares, ya que en condiciones fisiológicas un resto ácido desprotonado en el compuesto, tal como un grupo carboxilo, puede ser aniónico, y esta carga electrónica se podría entonces desequilibrar internamente contra la carga catiónica de un resto básico protonado o alquilado, tal como un átomo de nitrógeno cuaternario.

UTILIDAD

Los compuestos de la presente invención son inhibidores de la actividad de la Akt y de este modo son útiles en el tratamiento de cáncer, en particular cánceres asociados a irregularidades en

la actividad de la Akt y dianas celulares cadena abajo de la Akt. Tales cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de ovario, pancreático, mama y de próstata, así como cánceres (incluyendo glioblastoma) donde PTEN supresor de tumores está mutado (Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89: 9267 - 9271; Cheng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1996) 93: 3636 - 3641;

- 5 Bellacosa et al., *Int. J. Cancer* (1995) 64: 280 - 285; Nakatani et al., *J. Biol. Chem.* (1999) 274: 21528 - 21532; Graff, *Expert. Opin. Ther. Targets* (2002) 6(1): 103 - 113; y Yamada y Araki, *J. Cell Science.* (2001) 114: 2375 - 2382; Mischel y Cloughesy, *Cerebro Pathol.* (2003) 13 (1): 52 - 61).

- Los compuestos, composiciones, y procedimientos proporcionados en el presente documento se consideran particularmente útiles para el tratamiento de cáncer. Los cánceres que se pueden tratar por los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a: Cardíaco: sarcoma (angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma), mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma y teratoma; Pulmón: pulmón de células no pequeñas, carcinoma broncogénico (célula escamosa, célula pequeña no diferenciada, célula grande no diferenciada, adenocarcinoma), alveolar (bronquiolar) carcinoma, adenoma bronquial, sarcoma, linfoma, hamartoma condromatoso, mesotelioma; Gastrointestinal: esófago (carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, limfoma), estómago (carcinoma, limfoma, leiomiomasarcoma), páncreas (adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, vipoma), intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, fibroma), intestino grueso (adenocarcinoma, adenoma tubular, adenoma vellosa, hamartoma, leiomioma), colon, colorrectal, rectal; tracto genitourinario: riñón (adenocarcinoma, tumor de Wilm' [nefroblastoma], limfoma, leucemia), vejiga y uretra (carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transitorias, adenocarcinoma), próstata (adenocarcinoma, sarcoma), testículos (seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, carcinoma de células intersticiales, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoideos, lipoma); Hígado: hepatoma (carcinoma hepatocelular), colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, hemangioma; Hueso: sarcoma osteogénico (osteosarcoma), fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, cordoma tumoral de células gigantes malignas, osteocronfoma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, condromixofibroma, osteoma osteoide y tumores de células gigantes; Sistema nervioso: cráneo(osteoma, hemangioma, granuloma, xantoma, osteitis deformans), meninges (meningioma, meningiosarcoma, gliomatosis), cerebro (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, endimoma, germinoma [pinealoma], glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma, retinoblastoma, tumores congénitos), neurofibroma de la médula espinal, meningioma, glioma, sarcoma); Ginecológico: útero (carcinoma de endometrio), cuello uterino (carcinoma cervical, displasia cervical pretumoral), ovarios (carcinoma de ovario

[cistadenocarcinoma seroso, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma no clasificado], tumores de células granulosa-tecales, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, teratoma maligno), vulva (carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma, fibrosarcoma, melanoma), vagina (carcinoma de células transparentes, carcinoma de células escamosas, sarcoma botrioide (rabdiosarcoma embrionario), tubos de Falopio (carcinoma);

5 Hematológico: sangre (leucemia mieloide [aguda y crónica], leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, enfermedades mieloproliferativas, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico), enfermedad de Hodgkin, linfoma de no-Hodgkin [linfoma maligno]; Piel: melanoma maligno, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de

10 Karposi, nevi displásico de moles, lipoma, angioma, dermatofibroma, queloides, psoriasis; y Glándulas adrenales: neuroblastoma. De este modo, el término "célula cancerosa" como se proporciona en el presente documento, incluye una célula aquejada de cualquiera de las afecciones anteriormente mencionadas.

Los cánceres que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a: mama, próstata, colon, colorrectal,

15 pulmón, pulmón de células no pequeñas, cerebro, testicular, estómago, páncreas, piel, intestino delgado, intestino grueso, garganta, cabeza y cuello, oral, hueso, hígado, vejiga, riñón, tiroides y sangre.

Los cánceres que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención incluyen: mama, próstata, colon, ovario, colorrectal, pulmón y

20 pulmón de células no pequeñas.

Los cánceres que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención incluyen: mama, colon, (colorrectal) y pulmón (pulmón de células no pequeñas).

Los cánceres que se pueden tratar mediante los compuestos, composiciones y procedimientos de la invención incluyen: linfoma y leucemia.

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de cáncer de mama.

Los compuestos de la presente invención son útiles para el tratamiento de cáncer

30 de próstata.

La señalización de la Akt regula múltiples etapas críticas en angiogénesis. Shiojima y Walsh, *Circ. Res.* (2002) 90: 1243 - 1250. La utilidad de los inhibidores de angiogénesis en el tratamiento de cáncer se conoce en la bibliografía, véase J. Rak et al. *Cancer Research*, 55: 4575 - 4580, 1995 y Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2 (8): 953 -

35 966, por ejemplo. El papel de la angiogénesis en cáncer se ha mostrado en numerosos tipos de cáncer y tejidos: carcinoma de mama (G. Gasparini y A.L. Harris, *J. Clin. Oncol.*, 1995, 13: 765 - 782; M. Toi et al., *Japan. J. Cancer Res.*, 1994, 85: 1045 - 1049); carcinomas de vejiga (A.J.

Dickinson et al., *Br. J. Urol.*, 1994, 74: 762 - 766); carcinomas de colon (L.M. Ellis et al., *Surgery*, 1996, 120 (5): 871 - 878); y tumores de la cavidad oral (J.K. Williams et al., *Am. J. Surg.*, 1994, 168: 373 - 380). Otros cánceres incluyen, tumores avanzados, leucemia de células vellosas, melanoma, cabeza y cuello avanzado, célula renal metastático, linfoma no-Hodgkin, mama metastático, adenocarcinoma de mama, melanoma avanzado, pancreático, gástrico, glioblastoma, pulmón, ovarios, pulmón de células no pequeñas, próstata, pulmón de células pequeñas, carcinoma de células renales, diversos tumores sólidos, mieloma múltiple, próstata metastático, glioma maligno, cáncer renal, linfoma, enfermedad metastática refractaria, mieloma múltiple refractario, cáncer cervical, sarcoma de Kaposi, glioma anaplásico recurrente, y cáncer de colon metastático (Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2 (8): 953 - 966). De este modo, los inhibidores de la Akt descritos en la presente solicitud también son útiles en el tratamiento de estos cánceres relacionados con angiogénesis.

Los tumores que han experimentado neovascularización muestran un potencial aumentado para metástasis. De hecho, la angiogénesis es esencial para el desarrollo de tumores y metástasis. (S.P. Cunningham, et al., *Can. Research*, 61: 3206 - 3211 (2001)). Los inhibidores de la Akt descritos en la presente solicitud son por lo tanto útiles para prevenir o disminuir metástasis de células tumorales.

Incluido además dentro del alcance de la invención es un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad en la que está implicada la angiogénesis, que comprende la administración a un mamífero en necesidad del mismo de tal tratamiento de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Las enfermedades neovasculares son un ejemplo de afecciones donde mucho del daño del tejido resultante se puede atribuir a una infiltración aberrante de vasos sanguíneos en el ojo (véase el documento WO 00/30651, publicado el 2 de junio de 2000). La infiltración no deseable se puede disparar por la retinopatía isquémica, tal como la resultante de retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, oclusiones de la vena retinal, etc., o por enfermedades degenerativas, tales como la neovascularización observada en la degeneración vascular relacionada con la edad. La inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos mediante la administración de los presentes compuestos prevendría por lo tanto la infiltración de vasos sanguíneos y prevendría o trataría enfermedades donde la angiogénesis está implicada, tales como enfermedades oculares de tipo vascularización retinal, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, y similares.

Incluido además dentro del alcance de la invención es un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad no maligna en la que está implicada la angiogénesis, que incluye, pero no se limita a: enfermedades oculares (tales como vascularización retinal, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad), aterosclerosis, artritis, psoriasis, obesidad y enfermedad de Alzheimer (Dredge et al., *Expert Opin. Biol. Ther.* (2002) 2 (8): 953 - 966). En otra realización, un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad en la que está implicada la angiogénesis incluye: enfermedades oculares (tales como,

vascularización retinal, retinopatía diabética y degeneración macular relacionada con la edad), aterosclerosis, artritis y psoriasis.

5 Incluido además dentro del alcance de la invención es un procedimiento de tratamiento de trastornos hiperproliferativos tales como reestenosis, inflamación, enfermedades autoinmunes y alergia/asma.

Incluido además dentro del alcance de la invención es the use of the instant compounds to coat stents y therefore the use of the instant compounds on coated stents for the treatment and/or prevention of restenosis (WO03/032809).

10 Incluido además dentro del alcance de la invención es el uso de los compuestos presenets para el tratamiento y / o prevención de osteoartritis (documento WO03/035048).

Incluido además dentro del alcance de la invención es un procedimiento de tratamiento de hiperinsulinismo.

15 Los compuestos de la invención son también útiles en la preparación de un medicamento que es útil en el tratamiento de las enfermedades descritas anteriormente, en particular cáncer.

En una realización de la invención, el compuesto presente es un inhibidor de selectivo cuya eficacia inhibidora depende del dominio PH. En esta realización, el compuesto muestra una disminución de la actividad inhibidora *in vitro* o no actividad inhibidora *in vitro* contra las proteínas de Akt truncadas que acrecen del dominio PH.

20 En una realización adicional, el presente compuesto se selecciona entre el grupo de un inhibidor selectivo de la Akt1, un inhibidor selectivo de la Akt2 y un inhibidor selectivo de tanto la Akt1 como la Akt2.

25 En otra realización, el presente compuesto se selecciona entre el grupo de un inhibidor selectivo de la Akt1, un inhibidor selectivo de la Akt2, un inhibidor selectivo de la Akt3 y un inhibidor selectivo de dos de las tres isoformas de Akt.

En otra realización, el presente compuesto es un inhibidor selectivo de las tres isoformas Akt, pero no es un inhibidor de una, dos o todas tales isoformas de la Akt que han sido modificadas para suprimir el dominio PH, la región bisagra o tanto el dominio PH como la región bisagra.

30 La presente invención además se refiere a un procedimiento de inhibición de la actividad de la Akt que comprende la administración a un mamífero en necesidad del mismo de una cantidad farmacéuticamente eficaz del presente compuesto.

35 Los compuestos de esta invención se pueden administrar a mamíferos, incluyendo seres humanos, o bien solos o, en combinación con vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, en una composición farmacéutica, de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional. Los compuestos se pueden administrar por vía oral o parenteral, incluyendo las vías de administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, rectal y tópica.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el ingrediente activo pueden estar en una forma adecuada para uso oral, por ejemplo, en forma de comprimidos, trociscos, grageas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos dispersables o gránulos, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones propuestas para uso oral se pueden preparar según cualquier procedimiento conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados entre el grupo constituido por agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el fin de preparar preparaciones farmacéuticamente elegantes y palatables. Los comprimidos contienen el ingrediente activo en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes granuladores y agentes disgregadores, por ejemplo, celulosa microcristalina, croscarmelosa de sodio, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes de aglutinantes, por ejemplo, almidón, gelatina, polivinilpirrolidona, o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos se pueden estar no recubiertos o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas para enmascarar el sabor desagradable del fármaco o retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proporcionan una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material que enmascara el sabor soluble en agua tal como hidroxipropilmetil celulosa, o un material retardante tal como etilcelulosa, celulosa acetato butirato.

Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como cápsulas duras de gelatina en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o en forma de cápsulas blandas de gelatina, en las que el ingrediente activo se mezcla con vehículo soluble en agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen el material activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetileneoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sobitol polioxietilenado, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitol polietilenado. Las suspensiones acuosas pueden también contener uno o más

46

conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes tales como sacarosa, sacarina o aspartamo.

5 Las suspensiones oleosas se pueden formular suspendiendo el ingrediente activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes tales como los expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes se pueden añadir para proporcionar una preparación oral palatable. Estas composiciones se pueden
10 conservar mediante la adición de un antioxidante tal como hidroxianisol butilado o alfatocoferol.

Los polvos dispersables y gránulos adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en mezcla con un agente dispersante o agente humectante, agente de suspensión, y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión se ejemplifican mediante los ya
15 mencionados anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo, agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite
20 de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser fosfátidos de origen natural por ejemplo, lecitina de semilla de soja y derivados de ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietilenado. Las
25 emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes, aromatizantes conservantes y antioxidantes.

Los jarabes y elixires se pueden formular con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Dichas formulaciones también pueden contener un emoliente, un conservante, agentes aromatizantes y colorantes y antioxidante.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de soluciones acuosas inyectables estériles. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico.

La preparación inyectable estéril también puede ser una microemulsión inyectable estéril de aceite en agua donde el ingrediente activo se disuelve en la fase oleosa. Por ejemplo, el
35 ingrediente activo se puede disolver primero en una mezcla de aceite de soja y lecitina. La solución oleosa se introduce después en una mezcla de agua y glicerol y se procesa para formar una microemulsión.

Las soluciones inyectables o microemulsiones se pueden introducir en el torrente sanguíneo del paciente mediante inyección del bolo. Como alternativa, puede ser ventajoso administrar la solución o microemulsión de tal forma que se mantenga una concentración circulante constante del presente compuesto. Con el fin de mantener tal concentración constante, se puede usar un dispositivo de distribución intravenoso constante. Un ejemplo de tal dispositivo es la bomba intravenosa CADD-PLUS™ modelo 5400 de Deltec.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en la forma de una suspensión acuosa u oleaginosas inyectable estéril para la administración intramuscular y subcutánea. Esta suspensión se puede formular según la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico, por ejemplo, en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Además, se emplean convencionalmente aceites, estériles, no volátiles como un medio de disolvente o de suspensión. Para este propósito se puede emplear cualquier aceite no volátil blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

Los compuestos de fórmula C o E también se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal del fármaco. Estas composiciones se pueden preparar mezclando el fármaco con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Dichos materiales son manteca de cacao, gelatina de glicerina, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

Para uso tópico, se emplean cremas, pomadas, gelatinas, soluciones o suspensiones, etc., que contienen el compuesto de fórmula A. (Para propósitos de esta aplicación, la aplicación tópica incluirá lavados de boca y gárgaras.)

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar en forma intranasal mediante uso tópico de vehículos intranasales adecuados y dispositivos de distribución, o mediante vías transdérmicas, usando las formas de parches cutáneos transdérmicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Para administrar en la forma de un sistema de distribución transdérmico, la administración de dosificación, de hecho, será continua mejor que intermitente a lo largo del régimen de dosificación. Los compuestos de la presente invención también se pueden distribuir en forma de un supositorio que emplea bases tales como manteca de cacao, gelatina de glicerina, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol.

Cuando una composición de acuerdo con esta invención se administra a un sujeto humano, la dosificación diaria normalmente la determinará el médico encargado variando en

96

general la dosificación de acuerdo con la edad, peso, y respuesta del paciente individual, así como de la gravedad de los síntomas del paciente.

El régimen de dosificación que utiliza los compuestos de la presente invención se pueden seleccionar de acuerdo con una diversidad de factores, que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y el tipo de cáncer que se está tratando; la gravedad (es decir, fase) del cáncer a tratar; la vía de administración; la función renal y hepática del paciente; y el compuesto particular o sal del mismo empleada. Los médicos expertos en la técnica pueden determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz del fármaco requerido para tratar, por ejemplo, para prevenir, inhibir (completa o parcialmente) o detener el progreso de la enfermedad.

Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden administrar en una dosis diaria total de hasta 10.000 mg. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar una vez al día (QD), o dividido en dosis múltiples diarias tales como dos veces al día (BID), y tres veces al día (TID). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a una dosis diaria total de hasta 10,000 mg, por ejemplo, 2.000 mg, 3.000 mg, 4.000 mg, 6.000 mg, 8.000 mg o 10.000 mg, que se puede administrar en una dosis diaria o se puede dividir en dosis múltiples diarias como se ha descrito anteriormente.

Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden administrar una dosis diaria total de hasta 1.000 mg. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar una vez al día (QD), o dividido en dosis múltiples diarias tales como dos veces al día (BID), y tres veces al día (TID). Los compuestos de la presente invención se pueden administrar a una dosis diaria total de hasta 1.000 mg, por ejemplo, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 600 mg, 800 mg o 1,000 mg, que se puede administrar en una dosis diaria o se puede dividir en dosis múltiples diarias como se ha descrito anteriormente.

Además, la administración puede ser continua, es decir, cada día, o de manera intermitente. Los términos "intermitente" o "de manera intermitente" como se usa en el presente documento significan parada y comienzo a intervalos o bien regulares o irregulares. Por ejemplo, la administración intermitente de un compuesto de la presente invención puede ser administración de uno a seis días a la semana o puede significar la administración en ciclos (por ejemplo administración diaria durante dos a ocho semanas consecutivas, después un período de descanso sin administración durante hasta una semana) o puede significar la administración en días alternativos.

Además, los compuestos de la presente invención se pueden administrar de acuerdo con cualquiera de los programas descritos anteriormente, consecutivamente durante unas pocas semanas, seguido de un período de descanso. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención se pueden administrar de acuerdo con uno cualquiera de los programas descritos anteriormente durante dos a ocho semanas, seguido de un período de descanso de una semana, o dos veces al día a una dosis de 100 - 500 mg durante tres a cinco días una semana. En otra

realización particular, los compuestos de la presente invención se pueden administrar tres veces al día durante dos semanas consecutivas, seguido de una semana de descanso.

Una cualquiera o más de las dosificaciones específicas y programas de dosificación de los compuestos de la presente invención, también pueden ser aplicables a una cualquiera o más de los agentes terapéuticos a usar en el tratamiento de combinación (de aquí en adelante denominado el "segundo agente terapéutico").

Además, la dosificación específica y programa de dosificación de este Segundo agente terapéutico puede además variar, y la dosis optima, program de dosificación y vía de administración se determinará basándose en el segundo agente terapéutico específico que se está usando.

De hecho, la vía de administración de los compuestos de la presente invención es independiente de la vía de administración del segundo agente terapéutico. En una realización, la administración de un compuesto de la presente invención es administración oral. En otra realización, la administración de la presente invención es administración intravenosa. De este modo, se acuerdo con estas realizaciones, un compuesto de la presente invención se administra por vía oral o intravenosa, y el segundo agente terapéutico se puede administrar por vía oral, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, transdérmica, sublingual, intramuscular, rectal, transbucal, intranasal, liposomal, mediante inhalación, vaginal, intraocular, mediante distribución local mediante catéter o dilatador vascular permanente, subcutánea, intraadiposa, intraarticular, intratecal, o en una forma de dosificación de liberación lenta.

Además, un compuesto de la presente invención y segundo agente terapéutico se puede administrar mediante el mismo modo de administración, es decir ambos agentes administrados por ejemplo por vía oral, mediante IV. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención administrar un compuesto de la presente invención mediante un modo de administración, por ejemplo oral, y para administrar el segundo agente terapéutico mediante otro modo de administración, por ejemplo IV o cualesquiera otros modos de administración descritos anteriormente.

El primer procedimiento de tratamiento, la administración de un compuesto de la presente invención, puede tener lugar antes del segundo procedimiento de tratamiento, es decir, el segundo agente terapéutico, después del tratamiento con el segundo agente terapéutico, en el mismo momento que el tratamiento con el segundo agente terapéutico, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un período de tratamiento total se puede decidir para un compuesto de la presente invención. El segundo agente terapéutico se puede administrar antes del comienzo del tratamiento con un compuesto de la presente invención o después del tratamiento con un compuesto de la presente invención. Además, tratamiento anticáncer se puede administrar durante el período de administración de un compuesto de la presente invención pero no necesita que se produzca durante el período completo d tratamiento de un compuesto de la presente invención.

Los presentes compuestos son también útiles en combinación con agentes terapéuticos, quimioterapéuticos y anticáncer. Las combinaciones de los compuestos descritos en la presente descripción con agentes terapéuticos, quimioterapéuticos y anticáncer están dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de tales agentes se pueden encontrar en

5 *Cancer Principles y Practice of Oncology* por V.T. Devita y S. Hellman (editores), 6ª edición (15 de febrero de 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers. Los expertos en la técnica serán capaces de discernir qué combinaciones de agentes serían útiles basándose en las características particulares de los fármacos y el cáncer implicado. Tales agentes incluyen los

10 andrógenos, moduladores de los receptores retinoides, agentes citotóxicos / citostáticos, agentes antiproliferativos, inhibidores de la prenil-proteína transferasa, inhibidores de la HMG-CoA reductasa y otros inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteasa de VIH, inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de la proliferación y señalización de la supervivencia celular, bisfosfonatos, inhibidores de la aromataasa, agentes terapéuticos de siARN, inhibidores de

15 la γ -secretasa, agentes que interfieren con tirosinaquinasas receptoras (RTKs) y agentes que interfieren con los puntos de control del ciclo celular. Los presentes compuestos son particularmente útiles cuando se coadministran con terapia de radiación.

Un compuesto de la presente invención también puede ser útil para tratar cáncer en combinación con los siguientes agentes terapéuticos: abarelix (Plenaxis depot®); aldesleukin (Prokine®); Aldesleukin (Proleukin®); Alemtuzumab (Campath®); alitretinoína (Panretin®); allopurinol (Zyloprim®); altretamina (Hexalen®); amifostina (Ethyol®); anastrozol (Arimidex®); trióxido de arsénico (Trisenox®); asparaginasa (Elspar®); azacitidina (Vidaza®); bevacizumab (Avastin®); cápsulas de bexaroteno (Targretin®); bexaroteno gel (Targretin®); bleomicina (Blenoxane®); bortezomib (Velcade®); busulfan intravenoso (Busulfex®); busulfan

25 oral (Myleran®); calusterona (Methosarb®); capecitabina (Xeloda®); carboplatino (Paraplatin®); carmustina (BCNU®, BiCNU®); carmustina (Gliadel®); carmustina con Polifeprosan 20 Implante (Gliadel Wafer®); celecoxib (Celebrex®); cetuximab (Erbix®); chlorambucil (Leukeran®); cisplatino (Platinol®); cladribina (Leustatin®, 2-CdA®); clofarabina (Clolar®); ciclofosfamida (Cytosan®, Neosar®); ciclofosfamida (Cytosan Injection®);

30 ciclofosfamida (Cytosan Tablet®); citarabina (Cytosar-U®); citarabina liposomal (DepoCyt®); dacarbazina (DTIC-Dome®); dactinomicina, actinomicina D (Cosmegen®); Darbepoyetina alfa (Aranesp®); daunorubicina liposomal (DanuoXome®); daunorubicina, daunomicina (Daunorubicin®); daunorubicina, daunomicina (Cerubidine®); Denileuquina diftix (Ontak®); dexrazoxana (Zinecard®); docetaxel (Taxotere®); doxorubicina (Adriamycin PFS®);

35 doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®); doxorubicina (Adriamycin PFS Injection®); doxorubicina liposomal (Doxil®); dromostanolona propionato (dromostanolone®); dromostanolona propionato (masterone injection®); Elliott's B Solution (Elliott's B Solution®); epirubicina (Ellence®); Epyetina alfa (epogen®); erlotinib (Tarceva®); estramustina (Emcyt®);

- etopósido fosfato (Etopophos®); etopósido, VP-16 (Vepesid®); exemestano (Aromasin®); Filgrastim (Neupogen®); floxuridina (intraarterial) (FUDR®); fludarabina (Fludara®); fluorouracilo, 5-FU (Adrucil®); fulvestrant (Faslodex®); gefitinib (Iressa®); gemcitabina (Gemzar®); gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®); goserelina acetato (Zoladex Implant®); goserelina acetato (Zoladex®); histrelina acetato (Histrelin implant®); hidroxurea (Hydrea®); Ibritumomab Tiuxetan (Zevalin®); idarubicina (Idamycin®); ifosfamida (IFEX®); imatinib mesilato (Gleevec®); interferon alfa 2a (Roferon A®); Interferon alfa-2b (Intron A®); irinotecan (Camptosar®); lenalidomida (Revlimid®); letrozol (Femara®); leucovorina (Wellcovorin®, Leucovorin®); Leuprolida Acetato (Eligard®); levamisol (Ergamisol®); lomustina, CCNU (CeeBU®); mecloretamina, mostaza nitrogenada (Mustargen®); megestrol acetato (Megace®); melfalan, L-PAM (Alkeran®); mercaptopurina, 6-MP (Purinethol®); mesna (Mesnex®); mesna (Mesnex tabs®); metotrexato (Methotrexate®); methoxsalen (Uvadex®); mitomycin C (Mutamycin®); mitotano (Lysodren®); mitoxantrono (Novantrone®); nandrolona fenpropionato (Durabolin-50®); nelarabina (Arranon®); Nofetumomab (Verluma®); Oprelvekin (Neumega®); oxaliplatino (Eloxatin®); paclitaxel (Paxene®); paclitaxel (Taxol®); paclitaxel partículas unidas a proteína (Abraxane®); palifermina (Kepivance®); pamidronato (Aredia®); pegademasa (Adagen (Pegademase Bovine)®); pegaspargasa (Oncaspar®); Pegfilgrastim (Neulasta®); pemetrexed disodio (Alimta®); pentostatina (Nipent®); pipobroman (Vercyte®); plicamicina, mitramicina (Mithracin®); porfimer sodio (Photofrin®); procarbazona (Matulane®); quinacrina (Atabrine®); Rasburicasa (Elitek®); Rituximab (Rituxan®); sargramostim (Leukine®); Sargramostim (Prokine®); sorafenib (Nexavar®); estreptozocina (Zanosar®); sunitinib maleato (Sutent®); talco (Sclerosol®); tamoxifen (Nolvadex®); temozolomida (Temodar®); tenipósido, VM-26 (Vumon®); testolactona (Teslac®); tioguanina, 6-TG (Thioguanine®); thiotepa (Thioplex®); topotecan (Hycamtin®); toremifeno (Fareston®); Tositumomab (Bexxar®); Tositumomab/I-131 tositumomab (Bexxar®); Trastuzumab (Herceptin®); tretinoin, ATRA (Vesanoid®); mostaza de Uracilo (Uracil Mustard Capsules®); valrubicina (Valstar®); vinblastina (Velban®); vincristina (Oncovin®); vinorelbina (Navelbine®); zoledronato (Zometa®) y vorinostat (Zolinza®).

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con taxanos.

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con docetaxel (Taxotere®).

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con vorinostat (Zolinza®).

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con el inhibidor de la aurora quinasa, MK-0457.

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con el inhibidor de mTor, AP 23573.

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con el inhibidor de IGF1R, MK-0646.

Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con satraplatino.

5 Los compuestos de la presente invención son útiles para tratar cáncer en combinación con lapatinib (Tykerb®).

De este modo, el alcance de la presente invención abarca el uso de los compuestos reivindicados en la presente invención en combinación con un segundo compuesto seleccionado entre: un modulador de los receptores de estrógenos, un modulador de los receptores de andrógenos, un modulador de los receptores retinoides, un agente citotóxico / citostático, un agente antiproliferativo, un inhibidor de la prenil-proteína transferasa, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, un inhibidor de la proteasa de VIH, un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la angiogénesis, agonistas de PPAR- γ , agonistas de PPAR- δ , un inhibidor de resistencia a multifármacos inherente, un agente antiemético, un agente útil en el tratamiento de anemia, un agente útil en el tratamiento de neutropenia, un fármaco potenciador inmunológico, un inhibidor de la proliferación y señalización de la supervivencia celular, un bisfosfonato, un inhibidor de la aromatasa, un agente terapéutico de siARN, inhibidores de la γ -secretasa, agentes que interfieren con tirosinaquinasas receptoras (RTKs), un agente que interfiere con un punto de control del ciclo celular y cualquiera de los agentes terapéuticos enumerados anteriormente.

El término "administración" y variantes del mismo (por ejemplo, "administrar" un compuesto) en referencia a un compuesto de la invención significa introducir el compuesto o un profármaco del compuesto en el sistema del animal en necesidad del mismo. Cuando el compuesto de la invención o profármaco del mismo se proporciona en combinación con uno o más agentes activos diferentes (por ejemplo, un agente citotóxico, etc.), "administración" y sus variantes se entiende cada uno que incluye la introducción simultánea y secuencial del compuesto o profármaco del mismo y otros agentes.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que, directa o indirectamente, se produce por combinación de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas.

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o ser humano que se busca por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

El término "que trata cáncer" o "tratamiento de cáncer" se refiere a la administración a un mamífero aquejado con una afección cancerosa y se refiere a un efecto que

alivia la afección cancerosa matando las células cancerosas, pero también a un efecto que da como resultado la inhibición de crecimiento y / o metástasis del cáncer.

En una realización, el inhibidor de la angiogénesis a usar como el segundo compuesto se selecciona entre un inhibidor de la tirosina quinasa, un inhibidor de factor de crecimiento derivado de epidermis, un inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, un inhibidor de la MMP (metaloproteasa de matriz), un bloqueador de integrina, interferón- α , interleuquina-12, pentosan polisulfato, un inhibidor de la ciclooxigenasa, carboxiamidotriazol, combretastatina A-4, esqualamina, 6-O-cloroacetil-carbonil)-fumagillol, talidomida, angiostatina, troponina-1, o un anticuerpo para VEGF. En una realización, el modulador de los receptores de estrógenos es tamoxifen o raloxifeno.

También se incluye en el alcance de las reivindicaciones un procedimiento de tratamiento de cáncer que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención en combinación con terapia de radiación y / o en combinación con un segundo compuesto seleccionado entre: un modulador de los receptores de estrógenos, un modulador de los receptores de andrógenos, un modulador de los receptores retinoides, un agente citotóxico / citostático, un agente antiproliferativo, un inhibidor de la prenil-proteína transferasa, un inhibidor de la HMG- CoA reductasa, un inhibidor de la proteasa de VIH , un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la angiogénesis, agonistas de PPAR- γ , agonistas de PPAR- δ , un inhibidor de resistencia a multifármacos inherente, un agente antiemético, un agente útil en el tratamiento de anemia, un agente útil en el tratamiento de neutropenia, un fármaco potenciador inmunológico, un inhibidor de la proliferación y señalización de la supervivencia celular, un bisfosfonato, un inhibidor de la aromatasa, un agente terapéutico de siARN, inhibidores de la γ -secretasa, agentes que interfieren con tirosinaquinasas receptoras (RTKs), un agente que interfiere con un punto de control del ciclo celular y cualquiera de los agentes terapéuticos enumerados anteriormente.

La presente invención también incluye una composición farmacéutica útil para tratar o prevenir cáncer que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención y un segundo compuesto seleccionado entre: un modulador de los receptores de estrógenos, un modulador de los receptores de andrógenos, un modulador de los receptores retinoides, un agente citotóxico / citostático, un agente antiproliferativo, un inhibidor de la prenil-proteína transferasa, un inhibidor de la HMG- CoA reductasa, un inhibidor de la proteasa de VIH , un inhibidor de la transcriptasa inversa, un inhibidor de la angiogénesis, un agonista de PPAR- γ , un agonista de PPAR- δ , un inhibidor de la proliferación y señalización de la supervivencia celular, un bisfosfonato, un inhibidor de la aromatasa, un agente terapéutico de siARN, inhibidores de la γ -secretasa, agentes que interfieren con tirosinaquinasas receptoras (RTKs), un agente que interfiere con un punto de control del ciclo celular y cualquiera de los agentes terapéuticos enumerados anteriormente.

Todas las patentes, publicaciones y solicitudes de patentes pendientes identificadas se incorporan en el presente documento como referencia.

Las abreviaturas usadas en la descripción de la química y ejemplos que sigue son:

AEBSF (fluoruro de p-aminobencetilsulfonil); BSA (albúmina sérica bovina); BuLi (n-Butil
 5 litio); CDCl_3 (cloroformo-d); CuI (yoduro de cobre); CuSO_4 (sulfato de cobre); DCE
 (dicloroetano); DCM (diclorometano); DEAD (diethilo azodicarboxilato de dietilo); DMF (N,N-
 dimetilformamida); DMSO (dimetil sulfóxido); DTT (ditiotreitól); EDTA (ácido etilen-diamina-
 tetra-acético); EGTA (ácido etilen-glicol-tetra-acético); EtOAc (acetato de etilo); EtOH (etanol);
 HOAc (ácido acético); HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento); HRMS (espectro de
 10 masas de alta resolución); IPA (alcohol isopropílico); LCMS (cromatografía de masas-
 espectrómetro de masas); LHMDs (bis(trimetilsilil)amiduro de litio); LRMS (espectro de masas
 de baja resolución); MeOH (metanol); MP-B(CN) H_3 (Macroporous cianoborohidriduro
 macroporoso); NaHCO_3 (bicarbonato de sodio); Na_2SO_4 (sulfato de sodio); $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$
 (triacetoxiborohidriduro de sodio); NH_4OAc (acetato de amonio); NBS (N-bromosuccinamida);
 15 NMR (resonancia magnética nuclear); PBS (solución salina tamponada con fosfato); PCR
 (reacción en cadena de la polimerasa); $\text{Pd}(\text{dppf})$ ([1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] paladio);
 $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$ (tetrakis-trifenilfosfina de paladio (0)); POCl_3 (oxicloruro de fósforo); PS-DIEA
 (polistiren diisopropiletilamina); PS-PPh $_3$ (polistiren-trifenil fosfina); TBAB (bromuro de
 tetrabutylammonio); TBAF (fluoruro de tetrabutylammonio); THF (tetrahidrofurano); TFA (ácido
 20 trifluoroacético); TMSCH_2N_2 (trimetilsilildiazometano) y Ac (acetil); BOC (t-butoxicarbonil);
 Bu (butilo); Cal (calculado); Calc'd (calculado); DIEA (diisopropiletilamina); DMAP (4-
 dimetilaminopiridina); EDC (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida); Eq (equivalentes);
 Et (etil); HOBT (hidroxibenzotriazol); IPA (isopropanol); LC/MS (cromatografía líquida-
 espectrómetro de masas); Me (metilo); MeCN (acetonitrilo); NMP (N-metilpirrolidinona); Pr
 25 (propilo); Pir (piridina); Sat (saturado) y Tonic (ácido p-toluenesulfónico).

Los compuestos de esta invención se pueden preparar empleando reacciones como se muestra en los siguientes esquemas de reacción, además de otras manipulaciones convencionales que se conocen en la bibliografía o se ejemplifican en los procedimientos experimentales. Por lo tanto, los esquemas de reacción ilustrativos más adelante, no están
 30 limitados por los compuestos enumerados o por cualesquiera sustituyentes particulares empleados para los propósitos ilustrativos. La numeración de sustituyentes como se muestra en los esquemas de reacción no se correlacionan necesariamente con los usados en las reivindicaciones y a menudo, para claridad, un único sustituyente se muestra unido al compuesto donde se permiten múltiples sustituyentes en las definiciones de la fórmula C o E en el presente
 35 documento anteriormente.

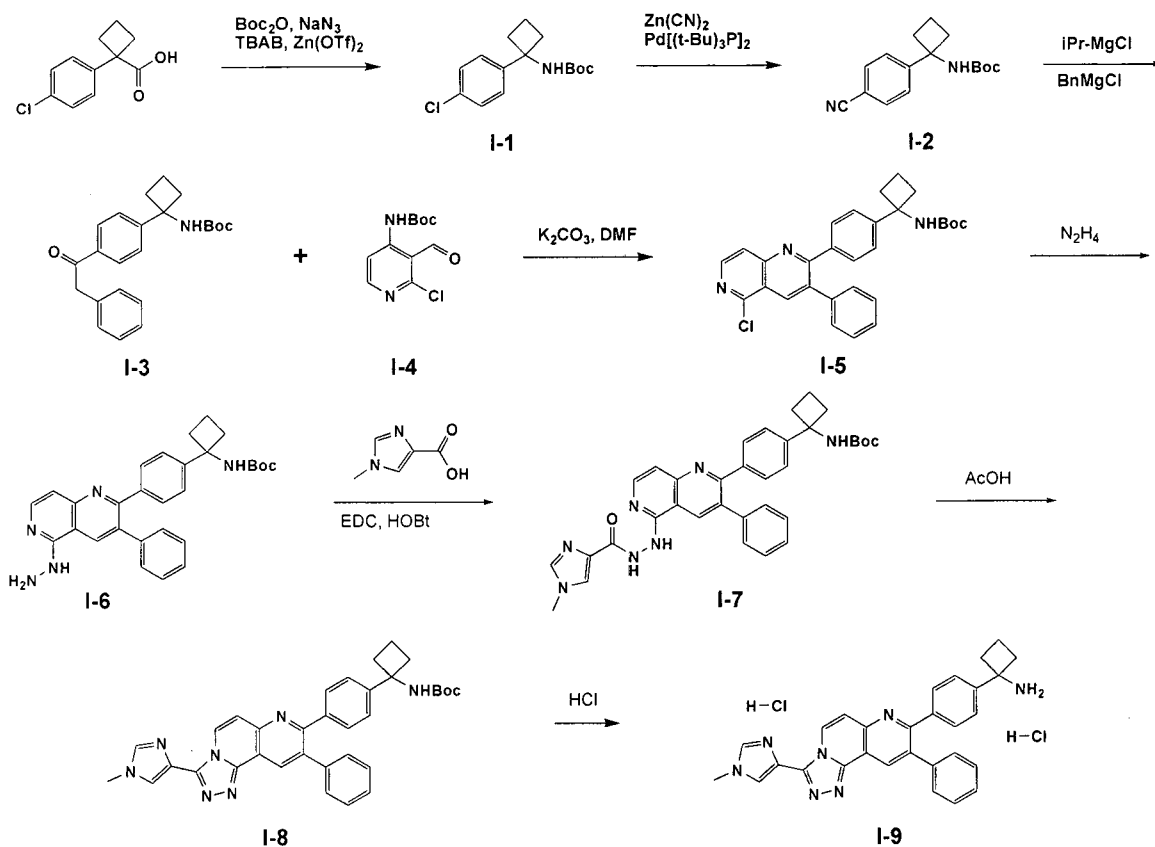
Sinopsis de los esquemas de reacción

Los siguientes esquemas de reacción, Esquemas de reacción I - III, proporcionan detalles útiles para preparar los presentes compuestos. Los intermedios requeridos están en algunos casos comercialmente disponibles o se pueden preparar de acuerdo con los procedimientos de la bibliografía.

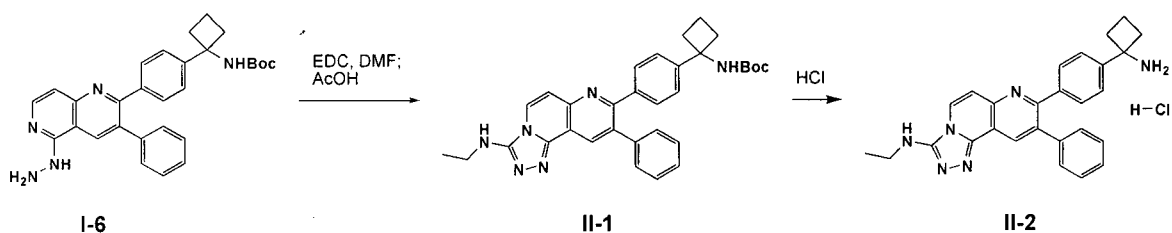
Como se ilustra en el Esquema de reacción I, un derivado del ácido cicloalquil(fenil)acético, en este caso ciclobutilo, se hace reaccionar primero y se reestructura en condiciones de tipo Curtius proporcionando el carbamato **I-1**. La cianación en este caso catalizada por paladio, proporciona nitrilo **I-2**. La desprotonación de **I-2** seguido de la reacción con un reactivo de Grignard de bencilo nucleófilo y procesamiento hidrolítico proporciona la cetona **I-3**. La condensación de **I-3** con aldehído **I-4** en condiciones básicas proporciona la cloronaftiridina **I-5**. El desplazamiento del cloro con hidrazina proporciona la hidrazida **I-6**. La acilación proporciona la hidrazida de acilo **I-7** que se cicla en condiciones ácidas proporciona la triazolonaftiridina **I-8**. La desprotección de la amina, en este caso con HCl, genera **I-9**.

Los compuestos de la presente invención en los que R¹ es un grupo aminoalquilo se puede preparar de acuerdo con los procedimientos indicados en el esquema de reacción II. La hidrazida **I-6** se hace reaccionar con una carbodiimida generando una urea que se cicla *in situ* en condiciones ácidas proporcionando el alquilaminotriazol **II-1**. Después la desprotección proporciona **II-2**.

Esquema de reacción I



Esquema de reacción II

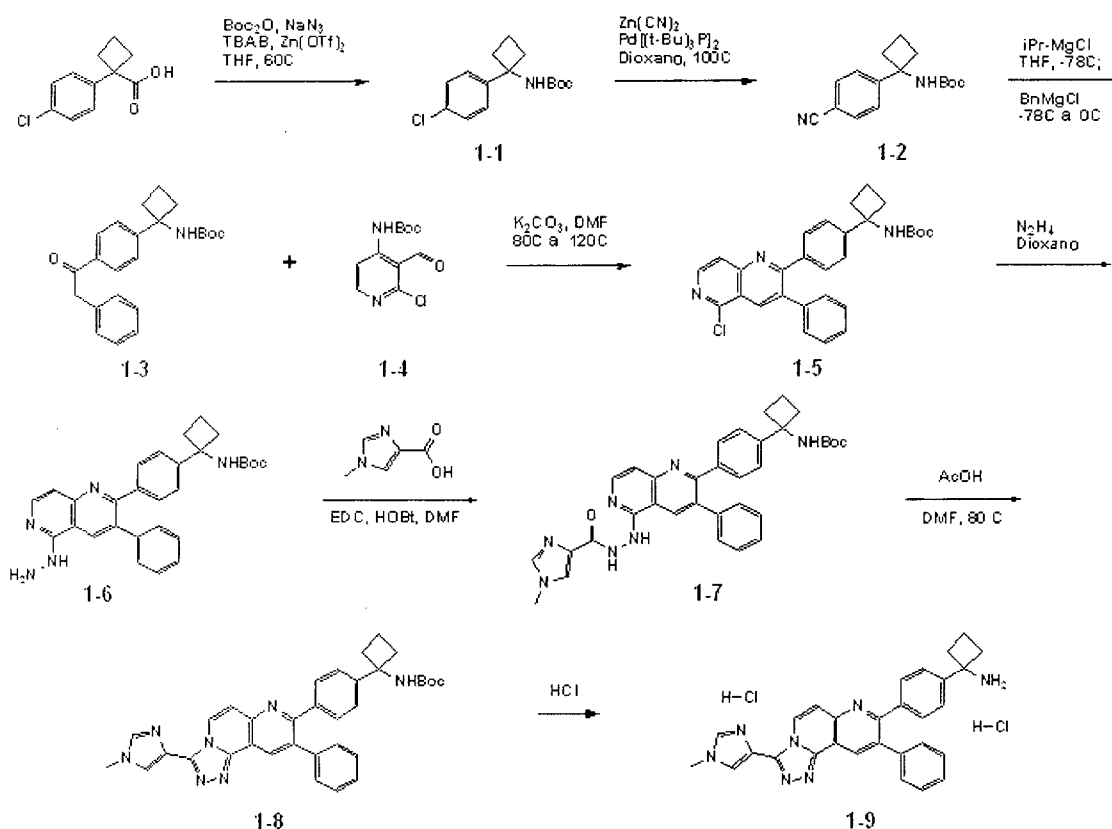


ad

EJEMPLOS

Los ejemplos y esquemas proporcionados pretenden ayudar en la comprensión adicional de la invención. Los materiales particulares empleados, especies y condiciones pretenden ser además ilustrativos de la invención y no limitan el alcance razonable de la misma.

ESQUEMA 1

[1-(4-clorofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (**1-1**)

A un matraz de fondo redondo se añadió ácido 1-(4-clorofenil)ciclobutanocarboxílico (40,4 g, 192 mmol), bicarbonato de di-*terc*-butilo (46,0 g, 211 mmol), azida de sodio (43,6 g, 671 mmol), bromuro de tetrabutylammonio (9,27 g, 28,7 mmol), trifluorometanosulfonato de cinc (2,30 g, 6,32 mmol), y THF (1 l). La mezcla de reacción se calentó hasta 60°C mientras se agitaba en un baño de aceite caliente con un condensador de reflujo enfriado con agua unido bajo una atmósfera de nitrógeno durante 18 horas. A la mezcla de reacción bruta se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio, se suspendió en acetato de etilo y se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo resultante se purificó

100

mediante cromatografía sobre gel de sílice (0 - 3% de IPA/DCM) proporcionando [1-(4-clorofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-1) en forma de un sólido de color blanco. HRMS (M+Na)⁺: observado = 304,1075, calculado = 304,1075.

[1-(4-cianofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-2)

5 A una solución de [1-(4-clorofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-1) (5,32 g, 18,9 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (70 ml) se añadió cianuro de cinc (2,44 g, 20,8 mmol), seguido de bis(tri-*t*-butilfosfina)paladio(0) (0,965 g, 1,89 mmol). La mezcla de reacción se calentó hasta 100°C mientras se agitaba en un baño de aceite caliente con un condensador de reflujo enfriado con agua unido en una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas. La mezcla de
10 reacción se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (0 - 5% de IPA/DCM) proporcionando [1-(4-cianofenil)ciclobutil] carbamato de *terc*-butilo (1-2) en forma de un sólido céreo de color blanquecino / amarillo . HRMS (M+H)⁺: observado = 273,1598, calculado = 273,1597.

{1-[4-(fenilacetil)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (1-3)

15 Una solución de [1-(4-cianofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-2) (16,6 g, 61,0 mmol) en THF anhidro (300 ml) se enfrió hasta -78°C mientras se agitaba bajo una atmósfera de nitrógeno. Después se añadió gota a gota una solución 2,0 M de cloruro de isopropilmagnesio en THF (30,5 ml, 61,0 mmol) durante 5 minutos. La mezcla de reacción se dejó en agitación a -78°C en una atmósfera de nitrógeno durante 10 minutos. Después se añadió
20 gota a gota una solución 2,0 M de cloruro de bencilmagnesio en THF (116 ml, 232 mmol) durante 10 minutos. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta 0°C. Después de 2 horas la mezcla de reacción se inactivó a 0°C mediante la adición de una solución saturada de cloruro de amonio. La reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de cloruro de amonio, una solución saturada de
25 bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (1 - 40% EtOAc/5% DCM/Hexano) proporcionando {1-[4-(fenilacetil)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (1-3) en forma de un sólido céreo blanquecino. HRMS (M+Na)⁺: observado = 388,1892, calculado = 388,1883.

30 {1-[4-(5-cloro-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil] ciclobutil} carbamato de *terc*-butilo (1-5)

A un matraz de fondo redondo se añadió {1-[4-(fenilacetil)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (1-3) (2,7 g, 6,1 mmol), (2-cloro-3-formilpiridin-4-il)carbamato de *terc*-butilo (1-4) (1,6 g, 6,1 mmol), carbonato de potasio (5,0 g, 6,0 mmol), y DMF (20 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C mientras se agitaba en un baño de aceite caliente en una atmósfera de nitrógeno durante 15 horas. Después la mezcla de reacción se calentó hasta 120°C durante 1 hora. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta

temperatura ambiente, se añadió agua, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice (5-50% EtOAc/5%DCM/Hexano) proporcionando {1-[4-(5-cloro-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-5**) en forma de un sólido de color blanquecino. HRMS (M+H)⁺: observado = 486,1954, calculado = 486,1943.

{1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *terc*-butilo (**1-6**)

A un vial de microondas se añadió {1-[4-(5-cloro-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-5**) (4,05 g, 8,34 mmol), hidrazina anhidra (5,24 ml, 167 mmol), y 1,4-dioxano (15 ml). La mezcla de reacción después se calentó bajo irradiación de microondas durante 5 minutos a 100°C (alta absorción). La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío proporcionando {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6**) en forma de un sólido / espuma de color naranja. MS (M+H)⁺: observado = 482,3, calculado = 482,59.

{1-[4-(5-{2-[(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)carbonil]hidrazino}-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-7**)

A un matraz de fondo redondo se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6**) (3,94 g, 8,18 mmol), EDC (1,34 g, 10,6 mmol), HOBt (1,44 g, 10,6 mmol), ácido 1-metil-1*H*-imidazol-4-carboxílico (1,34 g, 10,6 mmol), y DMF (40 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 60°C mientras se agitaba bajo una atmósfera de nitrógeno en un baño de aceite. Después de 45 minutos la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío proporcionando {1-[4-(5-{2-[(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)carbonil]hidrazino}-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-7**) en forma de una espuma de color rojo. MS (M+H)⁺: observado = 590,3, calculado = 590,69.

(1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutil)carbamato de *terc*-butilo (**1-8**)

A un matraz de fondo redondo se añadió {1-[4-(5-{2-[(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)carbonil]hidrazino}-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-7**) (2,73 g, 4,63 mmol), ácido acético (5,30 ml, 93 mmol), y 1,4-dioxano (20 ml). La mezcla de reacción se calentó hasta 80°C mientras se agitaba abierto a la atmósfera (tapado) en un baño de aceite. Después de 3 horas la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo

102

resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice 1 - 15% IPA/DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se retiró a vacío. El residuo resultante se volvió a purificar mediante cromatografía en columna en fase inversa (Sunfire C18) eluyendo con gradiente de 5 a 95% de acetonitrilo / (0,1% de TFA / agua). Las fracciones apropiadas se

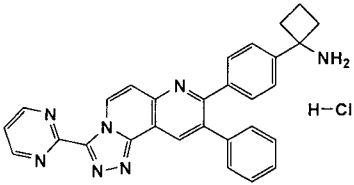
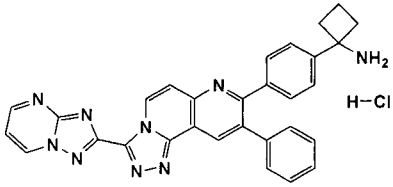
5 separaron mediante suspensión en acetato de etilo, se lavaron con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a vacío proporcionando (1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutil)carbamato de *tert*-butilo (**1-8**) en forma de un sólido de color blanquecino. MS (M+H)⁺: observado = 572,3, calculado = 572,7.

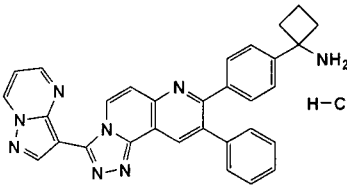
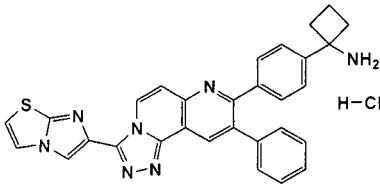
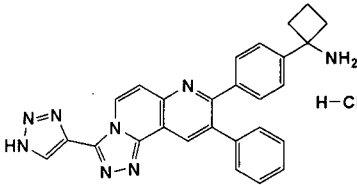
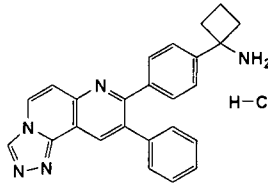
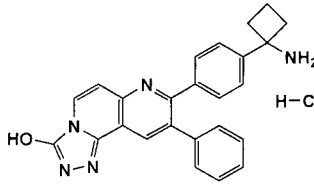
10 Diclorhidrato de 1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutanamina (**1-9**)

A una solución de (1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutil)carbamato de *tert*-butilo (**1-8**) (2,52 g, 4,41 mmol) en MeOH (5 ml) y DCM (15 ml) se añadió una solución 4N de HCl en EtOAc (22 ml, 88 mmol).

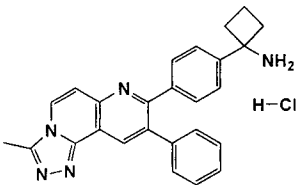
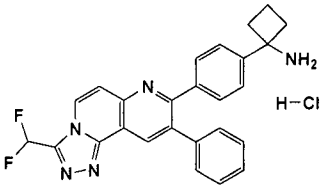
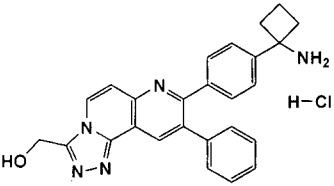
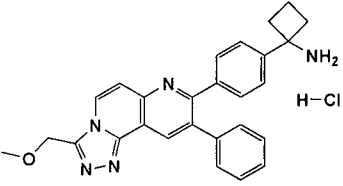
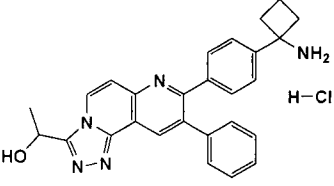
15 La mezcla de reacción sellada se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 4 horas la mezcla de reacción se concentró a vacío proporcionando diclorhidrato de 1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutanamina (**1-9**) en forma de un sólido de color amarillo. HRMS (M+H)⁺: observado = 472,2249, calculado = 472,2244.

20 Los siguientes compuestos se prepararon de manera similar al ejemplo **1-9**:

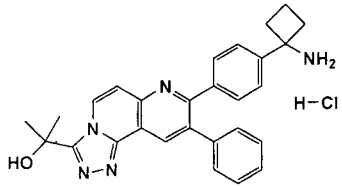
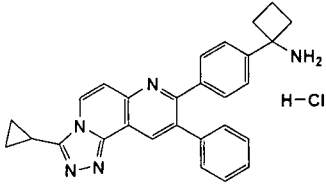
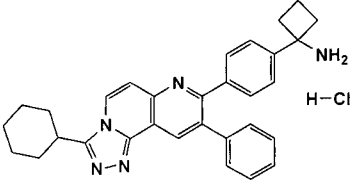
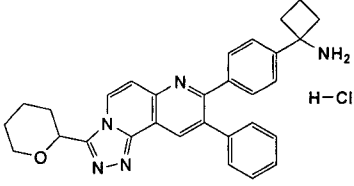
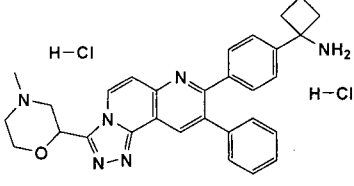
Cmp	Estructura	Calculado HRMS m/z (M+H) ⁺	Observado HRMS m/z (M+H) ⁺
1-10		470,2088	470,2068
1-11		510,2149	510,2124

1-12		509,2197	509,2192
1-13		514,1809	514,1799
1-14		459,2040	459,2081
1-15		392,1870	392,1856
1-16		408,1819	408,1803

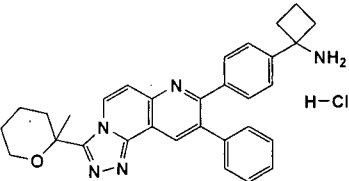
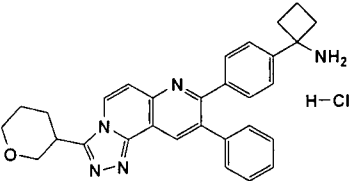
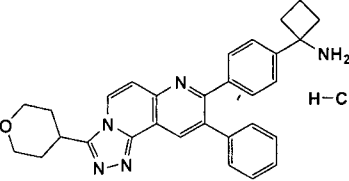
104

1-17	 <chem>Cn1nc2c(ncn2C1=CN3C=CC=C(C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6(NC7CC8CC8CC7)C6)C3=CC=CC=C3</chem> H-Cl	406,2026	406,2006
1-18	 <chem>Fc1nc2c(ncn2C1=CN3C=CC=C(C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6(NC7CC8CC8CC7)C6)C3=CC=CC=C3</chem> H-Cl	442,1838	442,1820
1-19	 <chem>OCc1nc2c(ncn2C1=CN3C=CC=C(C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6(NC7CC8CC8CC7)C6)C3=CC=CC=C3</chem> H-Cl	422,1976	422,1988
1-20	 <chem>COCc1nc2c(ncn2C1=CN3C=CC=C(C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6(NC7CC8CC8CC7)C6)C3=CC=CC=C3</chem> H-Cl	436,2132	436,2130
1-21	 <chem>CC(O)c1nc2c(ncn2C1=CN3C=CC=C(C3)C4=CC=C(C=C4)C5=CC=C(C=C5)C6(NC7CC8CC8CC7)C6)C3=CC=CC=C3</chem> H-Cl	436,2132	436,2116

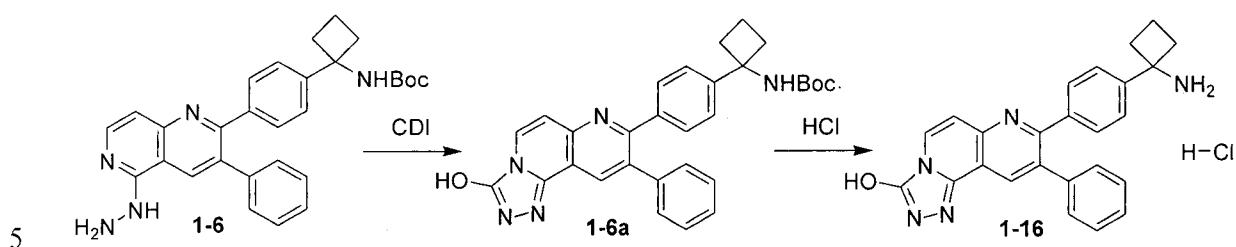
10

1-22	 <chem>CC(C)(O)c1nn2c(c1)nc(c2C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6N6)C7=CC=CC=C7N6</chem> H-Cl	450,2289	450,2303
1-23	 <chem>C1CC1c2nn3c(c2)nc(c3C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6N6)C7=CC=CC=C7N6</chem> H-Cl	432,2183	432,2190
1-24	 <chem>C1CCCCC1c2nn3c(c2)nc(c3C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6N6)C7=CC=CC=C7N6</chem> H-Cl	474,2652	474,2674
1-25	 <chem>C1CCOC1c2nn3c(c2)nc(c3C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6N6)C7=CC=CC=C7N6</chem> H-Cl	476,2445	476,2454
1-26	 <chem>C1CCN(C1)C2=CC=CC=C2C3=CC=CC=C3C4=CC=CC=C4N4</chem> H-Cl	491,2554	491,2564

106

1-27		490,2602	490,2616
1-28		476,2445	476,2469
1-29		476,2445	476,2471

ESQUEMA 1A



8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-3-ol (1-16)

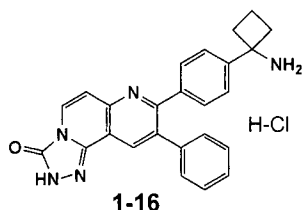
A un matraz de fondo redondo se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *tert*-butilo (1-6) (2,77 g, 5,75 mmol), y 1,1'-carbonilbis(1H-imidazol) (4,10 g, 4,40 mmol), en 1,4 Dioxano (30 ml). La mezcla de reacción sellada se calentó después a 95°C en una atmósfera de nitrógeno. A la mezcla de reacción bruta se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio (100 ml) y acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, después salmuera, se secó

10

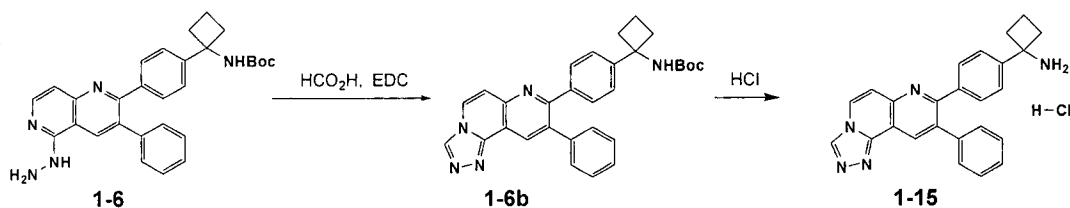
sobre sulfato de sodio, se filtró, y se concentró. El residuo resultante después se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con 0 - 10% IPA/DCM. Las fracciones apropiadas después se combinaron y el disolvente se retiró a vacío proporcionando {1-[4-(3-hydroxy-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-6a**) en forma de un sólido de color tostado. MS (M+H)⁺: observado = 508,1, calculado = 508,6.

A una solución de {1-[4-(3-hydroxy-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-6a**) (1,14 g, 2,25 mmol) en MeOH (5 ml) y DCM (15 ml) se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (22 ml, 88 mmol) a temperatura ambiente. Después de 4 horas la mezcla de reacción se concentró a vacío proporcionando clorhidrato de 8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-3-ol (**1-16**) en forma de un sólido de color amarillo. HRMS (M+H)⁺: observado = 408,1803, calculado = 408,1819.

Posteriormente, el análisis cristalográfico de rayos X del sólido de color amarillo indica que el compuesto sólido **1-16** existe en forma de la estructura química:
Clorhidrato de 8-[4-(1-Aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-3(2*H*)-ona



ESQUEMA 1B



{1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-15**)

A un matraz de fondo redondo se añadió EDC (569 mg, 2,97 mmol), HOBt (401 mg, 10,6 mmol), ácido fórmico (248 mg, 5,40 mmol), DCM (20 ml), & NMP (2,5 ml). La mezcla de reacción después se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Después se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-6**) (1,30 g, 2,70 mmol). La mezcla de reacción después se dejó agitar durante toda una noche a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción después se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una

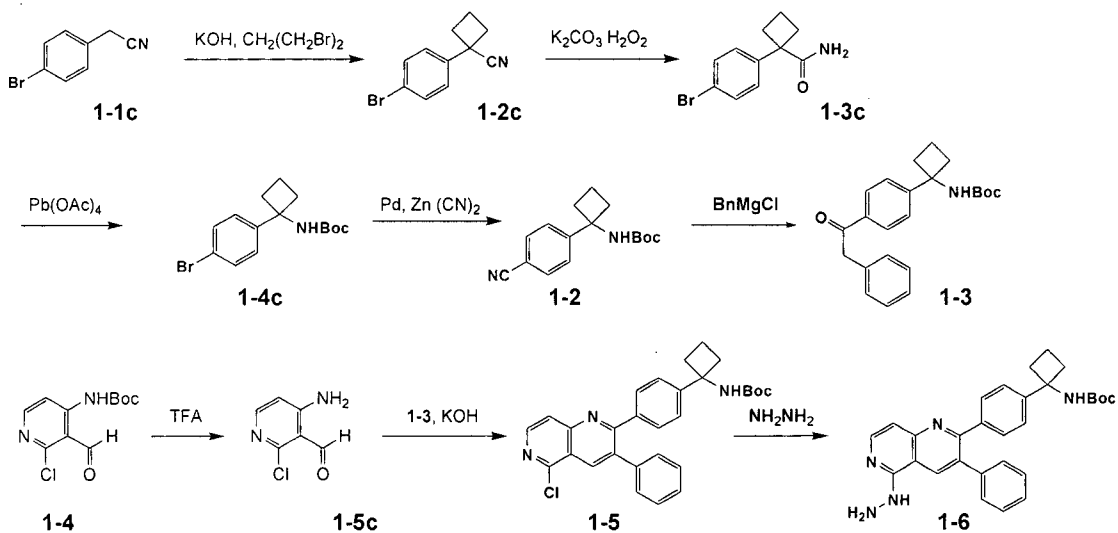
108

solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice 50-90% EtOAc/DCM, después 1 - 15% de IPA/DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se retiró a vacío proporcionando {1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-6b**) en forma de un sólido de color tostado. MS (M+H)⁺: observado = 492,2, calculado = 492,6.

Clorhidrato de 1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-15**)

A una solución de {1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *tert*-butilo (**1-6b**) (1,07 g, 2,177 mmol) en MeOH (5 ml) y DCM (15 ml) se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (5,44 ml, 21,77 mmol). La mezcla de reacción sellada se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 4 horas la mezcla de reacción se filtró proporcionando clorhidrato de 1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-15**) en forma de un sólido de color tostado. HRMS (M+H)⁺: observado = 392,1872, calculado = 392,1870.

ESQUEMA 1C



1-(4-bromofenil)ciclobutanocarbonitrilo (**1-2c**)

TBAB (1,61 g, 0,5 mmol), dibromopropano (22,2 g, 110 mmol), y nitrilo **1-1c** (19,6 g, 100 mmol) se añadieron a una solución agitada de KOH (31,17 g, 500 mmol) en una mezcla de 15 ml de agua y 200 ml de tolueno (temperatura mantenida entre 72 y 79 °C). La mezcla se calentó por vapor y se agitó a 99 - 108 °C durante 2,5 h. La mezcla se enfrió hasta 80 °C y se añadieron 200 ml de heptano. Después la mezcla resultante se enfrió hasta T A con agitación, se filtró la solución transparente superior, se lavó con agua (3 X 30 ml) y se concentró a vacío proporcionando un producto oleoso **1-2c**.

109

1-(4-bromofenil)ciclobutanocarboxamida (1-3c)

Se añadió H₂O₂ (30% 11,3 ml, 118 mmol) durante 3 h a una mezcla agitada de nitrilo **1-2c** (13,88 g, ~ 58,9 mmol) y K₂CO₃ (1,62 g, 11,8 mol) en 59 ml de DMSO a 40 - 87 °C, enfriando con un baño de agua. La mezcla resultante se enfrió hasta 27 °C y se añadió agua (100 ml) durante 30 min. Se formó producto cristalino **1-3c** formed. More agua (100 ml) se añadió durante 1 h. La suspensión resultante se dejó madurar a T A durante 16 h antes de filtración. La torta se enjuagó con 100 ml de agua y después con 100 ml de heptano. Después de secar en una estufa a vacío a 50 °C, se obtuvo el producto **1-3c** en forma de un sólido de color blanco.

[1-(4-bromofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-4c)

Pb(OAc)₄ (25,7 g, 25,7 mmol) se añadió a una solución agitada de la amida **1-3c** (12,7 g, 50 mmol) en 64 ml de t-BuOH a 57 °C hasta 86 °C enfriando con un baño de agua. La mezcla resultante se agitó a 65 - 86 °C durante 0,5 h. La mezcla se enfrió hasta 26 °C y se añadieron 12,7 g de Na₂CO₃ seguido de 65 ml MTBE. Después de 10 min, la mezcla se filtró. La torta se enjuagó con 10 l de MTBE y el filtrado combinado se lavó con 20 ml de agua y la fase orgánica después se lavó con 3 X 10 ml de KHCO₃ al 10% (precaución: burbujeo) se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró a vacío. El sólido resultante se enjuagó con 8 ml de IPAc y 8 ml de heptano y se secó en una estufa de vacío a 40 °C proporcionando el producto **1-4c** en forma de un sólido de color gris.

[1-(4-cianofenil)ciclobutil]carbamato de *terc*-butilo (1-2)

Una suspensión agitada de Pd₂dba₃ (101 mg; 1 mol %) y dppf (122 mg; 2 mol %) en DMF (25 ml) se pulverizó con nitrógeno durante 5 min y después se calentó hasta 65 °C y se dejó madurar durante 30 min. A esta temperatura se añadió el bromuro de arilo **1-4c** (3,6 g, 11 mmol), polvo de cinc (51 mg; 6 mol %) y el cianuro de cinc (777 mg; 0,60 equiv) enjuagando con DMF (5 ml). La solución se calentó hasta 92 - 95 °C y se dejó madurar durante 4 h. La solución se enfrió hasta T A durante toda una noche y se filtró a través de un lecho de Solka Floc, enjugando la torta con DMF (5 ml). Se añadió agua (30 ml) durante 3,5 h a 25 - 33 °C, junto con semilla. Después de dejar madurar durante toda una noche a T A, la solución cristalina resultante se filtró y se lavó con metanol acuoso y se secó durante toda una noche produciendo **1-2** en forma de un sólido de color amarillo.

{1-[4-fenilacetil]fenil}ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (1-3)

Bencil Grignard (19 ml, 38,5 mmol) se añadió a una solución agitada, ligeramente turbia de nitrilo **1-2** (3 g, 11 mmol) en THF (25 ml) enfriada hasta aproximadamente -20 °C a una velocidad tal que la temperatura de reacción no se calentó por encima de -10 °C. La solución se dejó madurar durante 3 - 4 horas manteniendo la temperatura de reacción entre -10 °C y -20 °C. La solución agitada se enfrió hasta -30 °C y se añadió a una solución acuosa al 15 % en peso de solución acuosa de ácido cítrico (60 ml) que se enfrió previamente hasta 5 - 10 °C, manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C. Se separaron las fases y la fase acuosa se lavó con MTBE.

10

Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con salmuera semisaturada (60 ml), y se concentraron a presión reducida. Se añadió heptano y la mezcla se concentró hasta una suspensión que se filtró, se lavó con heptano (15 ml) y se secó bajo nitrógeno proporcionando **1-3**.

5 4-Amino-2-cloronicotinaldehído (1-5c)

Ácido trifluoroácido acético (17,4 ml, 234 mmol) se añadió cuidadosamente a una mezcla agitada de Boc aldehído **1-4** (20 g, 78,1 mmol) y diclorometano (60 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 25 °C. La solución se calentó hasta 35 °C, se dejó madurar durante toda una noche (fuerte desprendimiento de gas) y después se enfrió hasta temperatura ambiente.

10 Se añadieron 25 ml de MTBE y la suspensión de color blanco resultante se dejó madurar durante una hora, se filtró, y la torta del filtro se enjuagó con MTBE (10 ml x 2). Se secó la sal de TFA **1-5c** a vacío.

{1-[4-(5-cloro-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *terc-butilo* (1-5)

15 Se añadió gota a gota solución de hidróxido de potasio al 45% en peso (18 ml; 5 equiv) durante 20 minutos a una mezcla agitada de sal TFA de cloropiridina **1-5c** (19,5 g), ciclobutilamino cetona **1-3** (26 g) e isopropanol (200 ml) manteniendo la temperatura por debajo de 24 °C. Después de 1 h, se añadió agua (100 ml) y después de 1 h la adicional la suspensión resultante se filtró, lavando con 2:1 de IPA/agua (30 ml, después 24 ml) después con agua (80 ml

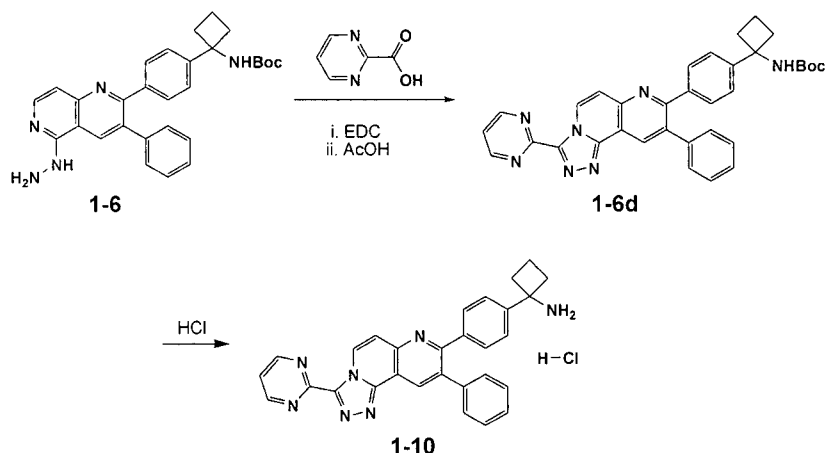
20 después 2 x 60 ml). El sólido se secó en flujo de nitrógeno produciendo **1-5** en forma de un sólido de color blanquecino.

{1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil} carbamato de *terc-butilo* (1-6)

25 Se añadió hidrazina anhidra (25 ml, 797 mmol) a una solución agitada de cloronaftiridina (**1-5**) (25,12 g, 51,7 mmol) en 1,4-dioxano (200 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno y la mezcla de reacción se calentó hasta 95°C. Después de 30 min la solución se enfrió hasta temperatura ambiente, se añadió acetato de etilo (400 ml) y la solución se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío proporcionando (**1-6**) en forma de un sólido de color

30 naranja.

ESQUEMA 1D



{1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6d**)

A un matraz de fondo redondo se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6**) (267 mg, 0,554 mmol), EDC (138 mg, 0,721 mmol), HOBt (97 mg, 0,721 mmol), ácido pirimidina-2-carboxílico (89 mg, 0,721 mmol), DIPEA (0,367 ml, 2,218 mmol), y DMF (3 ml). La mezcla de reacción después se tapó y se calentó bajo irradiación en microondas a 100°C durante 5 minutos. La mezcla se enfrió, se añadió ácido acético (0,476 ml, 8,32 mmol) y la reacción después se tapó y se calentó bajo irradiación en microondas a 80°C durante 5 minutos. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente, se suspendió en acetato de etilo, se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua, salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice 0 - 10% de IPA/DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se retiró a vacío proporcionando {1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6d**) en forma de un sólido de color naranja. MS (M+H)⁺: observado = 570,2, calculado = 570,7.

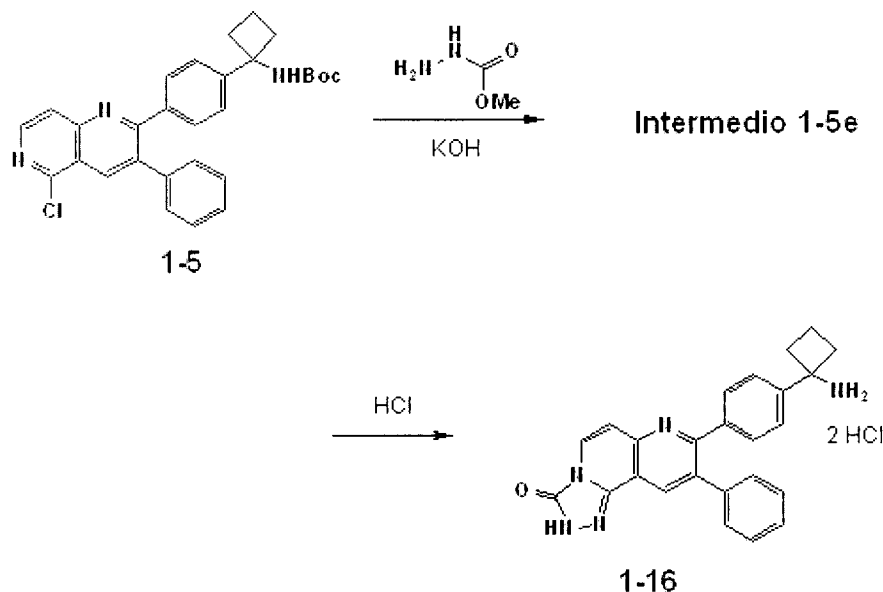
Clorhidrato de 1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-10**)

A una solución de {1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6d**) (71 mg, 0,125 mmol) en MeOH (2 ml) y DCM (3 ml) se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (3 ml, 12 mmol). La mezcla de reacción sellada se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 4 horas la mezcla de reacción se concentró. Después de 4 horas la mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna en fase inversa (Sunfire C18) eluyendo con gradiente 1 a 50% de acetonitrilo / (0,1% TFA / agua). Las fracciones apropiadas se concentraron a vacío. El residuo resultante se disolvió después en DCM (5 ml) y MeOH (5 ml), después se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (5 ml, 20 mmol), después se concentró a

112

vacío proporcionando clorhidrato de 1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-10**) en forma de un sólido de color tostado. HRMS ($M+H$)⁺: observado = 470,2098, calculado = 470,2088.

5

ESQUEMA 1E(SÍNTESIS ALTERNATIVA PARA EL COMPUESTO 1 - 16)Intermedio (1-5e)

Una suspensión agitada de cloronaftiridina **1-5** (1.8 g), carboxilato de metil hidrazina (0,318 g) e isopropanol (20 l) se calienta hasta 66 °C antes de que se haga homogénea. Se añade HCl 5 - 6 N en IPA (0,05 ml) y la temperatura se incrementa hasta 70 °C durante 16 horas y después se enfría RT. Después de enfriar hasta T A, se mezcla 45% en peso de solución de hidróxido de potasio (0,52 ml) con agua (5,5 ml) y se añade durante 15 minutos. Después de 30 minutos, se añade ácido acético acuosa (0,7 ml en 6 ml de agua) seguido de agua (2 ml). La suspensión resultante se deja madurar a T A durante tres horas, se filtra y se lava con 1:1 de IPA/agua (2 x 2,4 ml). El producto se seca en flujo de nitrógeno después se suspende en cloruro de metileno a 20 °C durante 4 horas, se filtra y se seca en un flujo de nitrógeno produciendo **1-5e** en forma de un sólido de color blanquecino.

20

8-[4-(1-Aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-3(2*H*)-ona (**1-16**)

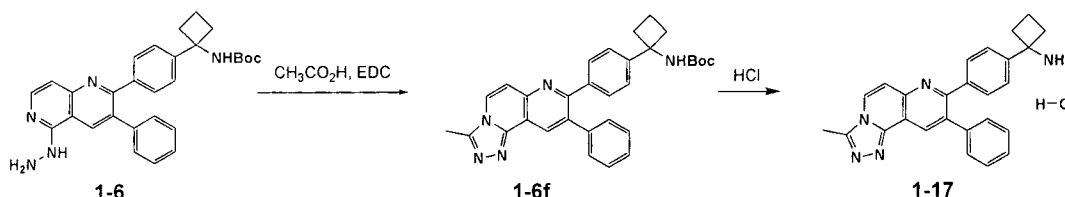
Una solución de HCl acuosa concentrada (12,1 M, 1,64 ml) en etanol (2,0 ml) se añadió gota a gota durante 30 min a una solución agitada de **1-5e** (500 mg, 0,985 mol) en etanol (1,7 ml) y agua (0,2 ml) a 50°C. Después de 3 horas después de la adición de ácido, la mezcla se sembró y se dejó madurar durante toda una noche a 50°C, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró. Se añadió cloruro de acetilo (0,5 g, 7 mmol) durante 1 h a etanol (2 ml) a 0°C. La

solución después se enfrió hasta temperatura ambiente y se dejó madurar durante 30 minutos. La torta del filtro se lavó con esta solución (1 ml x 2), después con acetato de etilo (4 ml x 2) y se secó, finalmente en una estufa de vacío a 75,0°C con barrido con nitrógeno (50 torr (6,67 kPa)) hasta que se observa la conversión completa de **1-16** Forma IV a la Forma II por XRPD.

5 El procedimiento empleado en el Esquema 1A proporcionó una sal HCl bis de **1-16** llamada Forma I. El procedimiento descrito en el Esquema 1E produjo tres nuevas polimorfos de sal HCl bis de **1-16**, llamadas Formas II, III y IV. Se encontró que el secado o bien la Forma III o Forma IV a presión reducida con un barrido de nitrógeno les convirtió completamente en la Forma II. La suspensión de una mezcla de la Forma I y II en etanol ácido produjo la Forma III en la suspensión. El aislamiento de la Forma III y secado como se ha descrito anteriormente produce la Forma II.

15 Una versión HCl de **1-16** también se produjo mediante en agua. Después de 6 horas, la suspensión acuosa se vuelve de color amarillo claro y se filtra. La valoración con cloruro de plata de este sólido revela la presencia de un equivalente de de cloruro. Finalmente, el tratamiento de la sal HCl bis de **1-16** con KOH acuoso (2 equiv) produce **1-16** neutro como se determina por valoración con cloruro.

ESQUEMA 1F



{1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6f**)

25 A un matraz de fondo redondo se añadió EDC (4,63 g, 24,17 mmol), HOBt (3,27 g, 24,17 mmol), DCM anhidro (50 ml) y ácido acético (13,2 ml, 13,86 mmol). La mezcla de reacción después se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Después se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6**) (10,58 g, 21,97 mmol). La mezcla de reacción después se dejó agitar durante toda una noche (18 horas) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno, después se calentó hasta 80°C durante 2 horas. La mezcla de reacción después se suspendió en acetato de etilo, se vertió lentamente una solución saturada de bicarbonato de sodio, seguido de agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice 1-35 20% de IPA/DCM. Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se retiró a vacío

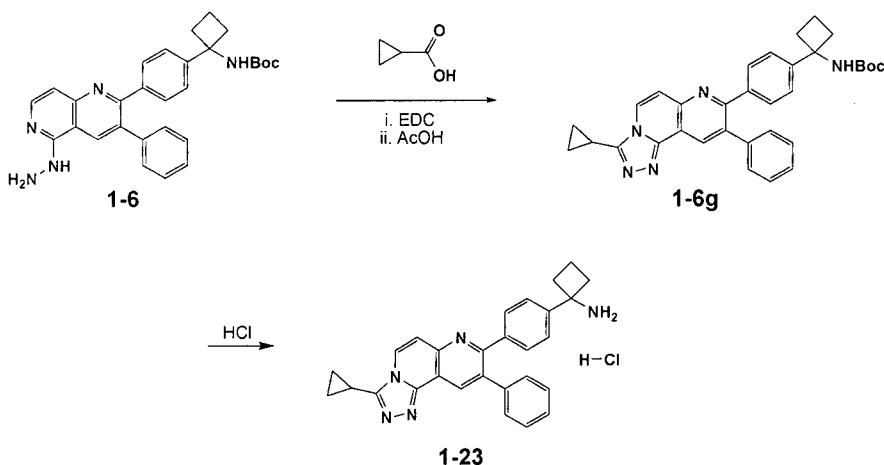
114

proporcionando tilo {1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6f**) en forma de un sólido de color tostado. MS (M+H)⁺: observado = 506,2, calculado = 506,6.

Clorhidrato de 1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-17**)

A una solución de {1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6f**) (9,23 g, 18,26 mmol) en MeOH (20 ml) y DCM (100 ml) se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (91 ml, 365 mmol). La mezcla de reacción sellada se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 18 horas la mezcla de reacción se filtró proporcionando clorhidrato de 1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-17**) en forma de un sólido de color blanquecino. HRMS (M+H)⁺: observado = 406.2047, calculado = 406,2026.

ESQUEMA 1G



{1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6g**)

A un matraz de fondo redondo se añadió EDC (535 mg, 2,79 mmol), HOBt (377 mg, 2,79 mmol), DCM anhidro (17,5 ml), NMP anhidro (.2,5 ml), y ácido ciclopropanecarboxílico (248 mg, 5,40 mmol). La mezcla de reacción después se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 minutos. Después se añadió {1-[4-(5-hidrazino-3-fenil-1,6-naftiridin-2-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6**) (1,221 g, 2,54 mmol). La mezcla de reacción después se dejó agitar durante toda una noche (18 horas) a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Se añadió ácido acético (2,178 ml, 38,0 mmol) y la mezcla de reacción se calentó en un baño de aceite caliente a 80°C durante 2 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y acetato de etilo se añadió y la mezcla se lavó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, agua y salmuera, se secó

15

sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a vacío. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía sobre gel de sílice 90% EtOAc/DCM (isocrático). Las fracciones apropiadas se combinaron y el disolvente se retiró a vacío proporcionando {1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (**1-6g**) en forma de un sólido de color rosa. HRMS (M+H)⁺: observado = 532.2729, calculado = 532.2707.

Clorhidrato de 1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-23**)

A una solución de {1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil}carbamato de *terc*-butilo (MJK-9) (899,4 mg, 18,26 mmol) en MeOH (5 ml) y DCM (15 ml) se añadió una solución 4 N de HCl en EtOAc (4,23 ml, 16,92 mmol). La mezcla de reacción sellada se dejó agitar a temperatura ambiente. Después de 18 horas la mezcla de reacción se filtró proporcionando clorhidrato de 1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina (**1-23**) en forma de un sólido de color amarillo. HRMS (M+H)⁺: observado = 432.2186, calculado = 432.2183.

EJEMPLO 1

Clonación de las isoformas de Akt y ΔPH-Akt1 humanas

El vector pS2neo (depositado en la ATCC el 3 de abril de 2001 como ATCC PTA-3253) se preparó como sigue: el vector pRmHA3 (preparado como se describe en *Nucl. Acid Res.* 16: 1043 - 1061 (1988)) se cortó con BglII y se aisló un fragmento de 2734 bp. El vector pUChsneo (preparado como se describe en *EMBO J.* 4: 167 - 171 (1985)) también se cortó con BglII y se aisló una banda de 4029 bp. Se ligaron conjuntamente estos dos fragmentos aislados generando un vector llamado pS2neo-1. Este plásmido contiene un polímero entre un promotor de metalotionina y un sitio de adición de la alcohol deshidrogenasa poli A. También tiene un gen de neo resistencia dirigido por un promotor de choque térmico. El vector pS2neo-1 se cortó con Psp5II y BsiWI. Se sintetizaron dos oligonucleótidos complementarios y después se hibridaron (CTGCGGCCGC (SEQ.ID.NO.: 1) y GTACGCGGCCGCAG (SEQ.ID.NO.: 2)). El corte pS2neo-1 y los oligonucleótidos hibridados se ligaron juntos generando un segundo vector, pS2neo. Añadido en esta conversión estaba un sitio NotI para ayudar en la linealización antes de la transfección en las células S2.

El gen humano Akt1 se amplificó mediante PCR (Clontech) a partir de un ADNc de bazo (Clontech) usando el cebador 5':

5'CGCGAATTCAGATCTACCATGAGCGACGTGGCTATTGTG 3' (SEQ.ID.NO.: 3), y el cebador 3': 5'CGCTCTAGAGGATCCTCAGGCCGTGCTGCTGGC3' (SEQ.ID.NO.: 4). El cebador 5' incluía un sitio EcoRI y BglIII. El cebador 3' incluía un sitio XbaI y BamHI para propósitos de clonación. El producto de PCR se subclonó en pGEM3Z (Promega) como un fragmento EcoRI/Xba I. Para los propósitos de expresión/purificación, un T tag intermedio se

116

añadió al extremo de 5' y el gen de longitud completa Akt1 usando el cebador de la PCR: 5'GTACGATGCTGAACGATATCTTCG 3' (SEQ.ID.NO.: 5). El producto de la PCR resultante abarcaba un sitio 5' KpnI y un sitio 3' BamHI que se usó para subclonar el fragmento en la fase con una marca de biotina que contiene el vector de expresión de células de insertos, pS2neo.

Para la expresión de una versión suprimida (Δ aa 4-129, que incluye la supresión de una parte de la región bisagra de Akt1) del dominio de homología de pleckstrina (PH), la mutagénesis de supresión de la PCR se hizo usando el gen de Akt1 de longitud completa en el vector pS2neo vector como molde. La PCR se llevó a cabo en 2 etapas usando los cebadores

internos de superposición
(5'GAATACATGCCGATGGAAAGCGACGGGGCTGAAGAGATGGAGGTG 3'
(SEQ.ID.NO.: 6), y 5'CCCCTCCATCTCTTCAGCCCCGTCGCTTTCCATCGGCATG
TATTC 3' (SEQ.ID.NO.: 7)) que abarcaban la supresión y los cebadores flanqueantes 5' y 3'
que abarcaban el sitio KpnI y marca T intermedia en el extremo 5'. El producto final de la PCR
se digirió con KpnI y SmaI y se ligó en el vector de corte pS2neo Akt1 KpnI/SmaI de longitud
completa, reemplazando de manera eficaz el extremo 5' del clon con la versión suprimida.

El gen Akt3 humano se amplificó mediante la PCR de ADNc de adulto (Clontech) usando el cebador oligo amino terminal:

5' GAATTCAGATCTACCATGAGCGATGTTACCATTTGTG 3' (SEQ.ID.NO.: 8); y el cebador

oligo carboxi terminal:

5' TCTAGATCTTATTCTCGTCCACTTGCAGAG 3' (SEQ.ID.NO.: 9).

Estos cebadores incluía un sitio 5' EcoRI/BglII y un sitio 3' XbaI/BglII para propósitos de clonación. El producto de la PCR resultante se clonó en los sitios EcoRI y XbaI de pGEM4Z (Promega). Para propósitos de reexpresión/purificación, una marca intermedia T se añadió al extremo 5' end de del clon Akt3 de longitud completa usando el cebador de la PCR:

5'GGTACCATGGAATACATGCCGATGGAAAGCGATGTTACCATTTGTGAAG

3' (SEQ.ID.NO.: 10). El producto de la PCR abarcaba un sitio 5' KpnI que permitía la clonación en fase con la marca de biotina que contenía el vector de expresión de células de insecto, pS2neo.

El gen Akt2 humano se amplificó mediante PCR a partir de ADNc humano (Clontech) usando el cebador oligo amino terminal:

5' AAGCTTAGATCTACCATGAATGAGGTGTCTGTC 3' (SEQ.ID.NO.: 11); y el cebador oligo carboxi terminal: 5'GAATTCGGATCCTCACTCGCGGATGCTGGC 3' (SEQ.ID.NO.: 12).

Estos cebadores incluían un sitio 5' HindIII/BglII y un sitio 3' EcoRI/BamHI para propósitos de clonación. El producto de la PCR resultante se subclonó en los sitios

HindIII/EcoRI de pGem3Z (Promega). Para los propósitos de expresión/purificación, una marca intermedia de T se añadió al extremo 5' y Akt2 de longitud completa usando el cebador de la PCR: 5'GGTACCATGGAATACATGCCGATGGAAAATGAGGTGTCTGTCATCAAAG 3'

11

(SEQ.ID.NO.: 13). El producto de la PCR resultante se subclonó en el vector pS2neo como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 2

Expresión de isoformas Akt humanas y Δ PH-Akt1

- 5 The ADN que contenía los genes clonados Akt1, Akt2, Akt3 y Δ PH-Akt1 en el vector de expresión pS2neo se purificó y se usó para transfectar células de *Drosophila* S2 (ATCC) mediante el procedimiento de fosfato de calcio. Se seleccionaron las combinaciones de células resistentes a antibióticos (G418, 500 μ g/ml). Las células se expandieron hasta un volumen de 1,0 L ($\sim 7,0 \times 10^6$ / ml), se añadieron biotina y CuSO_4 hasta una concentración final de 50 μ M y 50 mM respectivamente. Se desarrollaron las células durante 72 h a 27°C y se recogieron por centrifugación. La pasta de las células se congeló a -70°C según fuera necesario.

EJEMPLO 3

Purificación de isoformas de Akt y Δ PH-Akt1 humanas

- 15 La pasta de células de un litro de células S2 cells, descrito en el Ejemplo 2, se lisó mediante sonicación con 50 mls de 1% de CHAPS en tampón A: (50mM Tris pH 7,4, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,2mM AEBSF, 10 μ g/ml de benzamidina, 5 μ g/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina de cada uno, 10% de glicerol y 1mM DTT). La fracción soluble se purificó sobre una columna de flujo rápido Protein G Sepharose Pharmacia) cargada con 9 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-intermedio T eluido con 75 μ M de péptido EYMPME
20 (SEQ.ID.NO.: 14) en tampón A que contenía 25% de glicerol. Las fracciones que contenían Akt/PKB se reunieron y se evaluó la pureza de proteína mediante SDS-PAGE. Se cuantificó la proteína purificada usando un protocolo de Bradford convencional. La proteína purificada se ultracongeló sobre nitrógeno líquido y se congeló a -70°C.

- 25 Las supresiones del dominio de homología de Akt y Akt pleckstrina purificadas a partir de células S2 requerían activación. Se activaron las supresiones del dominio de homología de Akt y Akt pleckstrina (Alessi et al. *Current Biology* 7: 261 - 269) en una reacción que contenía 10 nM PDK1 (Upstate Biotechnology, Inc.), vesículas de lípidos (10 μ M fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato – Metreya, Inc, 100 μ M fosfatidilcholine y 100 μ M fosfatidilserina - Avanti Polar lipids, Inc.) y tampón de activación (50 mM Tris pH 7,4, 1,0 mM DTT, 0,1 mM EGTA, 1,0 μ M Microcystin-LR, 0.1 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 333 μ g/ml BSA y 0,1mM EDTA). La reacción se incubó a 22°C durante 4 horas. Se ultracongelaron alícuotas en nitrógeno líquido.

EJEMPLO 4

Ensayos de la Akt Quinasa

35 Se ensayaron isoformas de la Akt y construcciones de supresión del dominio de homología de pleckstrina utilizando un sustrato de péptido biotinilado derivado de GSK. Se

determinó la extensión de la fosforilación del péptido mediante Fluorescencia de Resolución Temporal Homogénea (HTRF) usando un anticuerpo monoclonal acoplado a lántanido quelato (Lance) específico para el fosfopéptido en combinación con un fluoróforo de alofocianina unido a estreptavidina (SA-APC) que se unirá al resto de biotina sobre el péptido. Cuando el Lance y APC están próximos (es decir, unido a la misma molécula de fosfopéptido), tiene lugar una transferencia de energía no radiactiva desde el Lance al APC, seguido de emisión de luz desde APC a 665 nm.

Material requerido para el ensayo:

- A. Isozima de la Akt o construcción suprimida del dominio de homología de pleckstrina
- B. Sustrato del péptido de la Akt: GSK3 α (S21) Péptido n° 3928 biotina-GGRARTSSFAEPG (SEQ.ID.NO.:15), Macromolecular Resources.
- C. Anticuerpo monoclonal anti-phospho GSK3 α marcado Lance (Cell Signaling Technology, clon n° 27).
- D. SA-APC (Prozyme n° de catálogo PJ25S lot n° 896067).
- E. Microfluor[®]B U Bottom Microtiter Plates (Dynex Technologies, n° de catálogo 7205).
- F. Discovery[®] HTRF Microplate Analyzer, Packard Instrument Company.
- G. 100 X Protease Inhibitor Cocktail (PIC): 1 mg/ml benzamidina, 0,5 mg/ml pepstatina, 0,5 mg/ml leupeptina, 0,5 mg/ml aprotinina.
- H. Tampón de ensayo 10X: 500 mM HEPES, pH 7,5, 1% PEG, mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% BSA, 20 mM 9-Glicerol fosfato.
- I. Tampón de inactivación: 50 mM HEPES pH 7,3, 16,6 mM EDTA, 0,1% BSA, 0.1% Triton X-100, 0,17 nM de anticuerpo monoclonal Lance clon n° 27, 0,0067 mg/ml de SA-APC
- J. Solución de trabajo ATP/MgCl₂: tampón de ensayo 1X, 1 mM DTT, 1X PIC, 125 mM KCl, 5% Glicerol, 25 mM MgCl₂, 375 TM ATP
- K. Solución de trabajo de enzimas: tampón de ensayo 1X, 1 mM DTT, 1X PIC, 5% de Glicerol, Akt activa. Las concentraciones de enzima final se seleccionaron de manera que el ensayo estaba en un intervalo de respuesta lineal.
- L. Solución de trabajo de Péptido: tampón de ensayo 1X, 1 mM DTT, 1X PIC, 5% de Glicerol, péptido biotinilado 2 TM GSK3 n° 3928

La reacción se realiza mediante la adición de 16 TL de la solución de trabajo ATP/MgCl₂ a los pocillos apropiados de una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se añade inhibidor o vehículo (1,0 TI) seguido de 10 TI de solución de trabajo de péptido. La reacción comienza mediante la adición de 13 TI de la solución de trabajo de enzima y mezclando. La reacción se dejó que procediera durante 50 min y después se detuvo mediante la adición de 60 TI

119

HTRF de tampón de inactivación. Las reacciones detenidas se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 30 min y después se leyeron en el instrumento Discovery.

Procedimiento para el ensayo de placa rápido de estreptavidina:

Etapas 1:

- 5 Un 1 µl de solución del compuesto de ensayo en 100% de DMSO se añadió a 20 µl de 2X de solución de distrito (20 µM Péptido GSK3, 300 µM ATP, 20 mM MgCl₂, 20 µCi / ml [³³P] ATP, 1X Tampón de ensayo, 5% de glicerol, 1 mM DTT, 1X PIC, 0,1% de BSA y 100 mM KCl). Las reacciones defosforilación se iniciaron mediante la adición de 19 µl de 2X de solución de enzimas (6,4 nM Akt activa/PKB, 1X Tampón de ensayo, 5% de glicerol, 1 mM DTT, 1X PIC y 0,1% de BSA). Las reacciones se incubaron después a temperatura ambiente durante 45 minutos.

Etapas 2:

- 15 La reacción se detuvo mediante la adición de 170 µl de 125 mM EDTA. Se transfirieron 200 µl de reacción detenida a Streptavidin Flashplate[®] PLUS (NEN Life Sciences, n° de catálogo SMP103). La placa se incubó durante ≥ 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas. Se aspiraron los contenidos de cada placa, y se enjuagaron los pocillos 2 veces con 200 µl de TBS por pocillo. Después los pocillos se lavaron 3 veces durante 5 minutos con 200 µl de TBS por pocillo incubando las placas a temperatura ambiente en un agitador de plataforma durante las etapas de lavado.

20

Se cubrieron las placas con una cinta de sellado y se contaron usando el Packard TopCount con los ajustes apropiados para recuento [³³P] en Flashplates.

Procedimiento para el ensayo de placa de filtro de Estreptavidina:

Etapas 1:

- 25 Las reacciones enzimáticas como se describen en la Etapa 1 del ensayo de placa ultrarrápida de Estreptavidina.

Etapas 2:

- 30 La reacción se detuvo mediante la adición de 20 µl de 7.5M clorhidrato de Guanidina. Se transfirieron 50 µl de la reacción de detención a la placa de filtro de Estreptavidina (SAM^{2™} Biotin Capture Plate, Promega, n° de catálogo V7542) y la reacción se incubó sobre el filtro durante 1 - 2 minutos antes de aplicar vacío.

- 35 La placa se lavó después usando un tubo múltiple de vacío como sigue: 1) 4 x 200 µl/pocillo de 2M NaCl; 2) 6 x 200 µl/pocillo de 2M NaCl con 1% de H₃PO₄; 3) 2 x 200 µl/pocillo de diH₂O; y 4) 2 x 100 µl/pocillo de 95% de Ethanol. Después se dejó que las membranas se secan al aire completamente antes de añadir líquido de centelleo.

Se selló el fondo de la placa con una cinta posterior de color blanco, se añadieron 30 µl/pocillo de Microscint 20 (Packard Instruments, n° de catálogo 6013621). La parte superior

20

de la placa se selló con una cinta de sellado transparente, y después se contó la placa usando el Packard TopCount con los ajustes apropiados para [^{33}P] con líquido de centelleo.

Procedimiento para el ensayo de placa de filtro de Fosfocelulosa:

Etapas 1:

- 5 Las reacciones enzimáticas se realizaron como se ha descrito en la etapa 1 del ensayo de placa ultrarrápida de Estreptavidina (anterior) utilizando KKGGRARTSSFAEPG (SEQ.ID.NO.: 16) como sustrato en lugar de biotina - GGRARTSSFAEPG.

Etapas 2:

- 10 La reacción se detuvo mediante la adición de 20 μl de 0,75% de H_3PO_4 . Se transfirieron 50 μl de la reacción de detención a la placa de filtro (UNIFILTER™, Whatman P81 Strong Cation Exchanger, placas de 96 pocillos de poliestireno de color blanco, Polyftronics, n° de catálogo 7700-3312) y la reacción se incubó en el filtro durante 1 - 2 minutos antes de aplicar vacío.

- 15 Se lavó la placa después un tubo múltiple de vacío como sigue: 1) 9 x 200 μl /pocillo de 0,75% de H_3PO_4 ; y 2) 2 x 200 μl /pocillo de dH_2O . Se selló el fondo de la placa con una cinta posterior de color blanco, se añadieron después 30 μl /pocillo de Microscint 20. La parte superior de la placa se selló con una cinta de sellado transparente, y se contó la placa usando el Packard TopCount con los ajustes apropiados para [^{33}P] con líquido de centelleo.

Ensayo de PKA:

- 20 Cada ensayo de PKA individual consta de los siguientes componentes:

A. 5X PKA tampón de ensayo (200 mM Tris pH 7,5, 100 mM MgCl_2 , 5mM 9 - mercaptoetanol, 0,5 mM EDTA)

B. 50 μM de solución madre de Kemptide (Sigma) diluido en agua

- 25 C. ^{33}P -ATP preparado diluyendo 1,0 μl ^{33}P -ATP [10 mCi/ml] en 200 Tl de una solución madre 50 μM de ATP no marcado

D. 10 μl de una solución madre 70 nM de la subunidad catalítica de PKA (UBI n° de catálogo 14-114) diluido en 0,5 mg/ml de BSA

E. Solución de trabajo de PKA/Kemptide: volúmenes iguales de 5X PKA tampón de ensayo, solución de Kemptide y subunidad catalítica PKA.

- 30 La reacción llevó a cabo en una placa de ensayo de 96 pocillos profundos. El inhibidor o vehículo (10 Tl) se añade a 10 Tl de la solución de ^{33}P -ATP. La reacción se inicia mediante la adición de 30 Tl de la solución de trabajo PKA/Kemptide a cada pocillo. La reacción se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 Tl de 100 mM EDTA y 100 mM pirofosfato de sodio y
35 mezclando.

El producto de reacción enzimático (Kemptide fosforilado) se recogió en placas de filtro de 96 pocillos de fosfocelulosa p81 (Millipore). Para preparar la placa, cada pocillo de una placa de filtro p81 filter se llenó con 75 mM d ácido fosfórico. Los pocillos se vaciaron a través

121

del filtro aplicando un vacío al fondo de la placa. Se añadió ácido fosfórico (75 mM, 170 μ l) a cada pocillo. Se añadió una alícuota de 30 μ l de cada reacción detenida de PKA a los pocillos correspondientes sobre la placa de filtro que contenía el ácido fosfórico. El péptido se atrapó sobre el filtro después de la aplicación de un vacío y se lavó el filtro 5 veces con 75 mM de ácido fosfórico. Después del lavado final, se dejó que los filtros se secaran al aire. Se añadió líquido de centelleo (30 μ l) a cada pocillo y se contaron los filtros en un TopCount (Packard).

Ensayo de PKC:

Cada ensayo de PKC consta de los siguientes componentes:

- A. 10X PKC tampón de co-activación : 2,5 mM EGTA, 4 mM CaCl_2
- 10 B. 5X PKC tampón de activación: 1,6 mg/ml fosfatidilserina, 0,16 mg/ml de diacilglicerol, 100 mM Tris pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 5 mM β -mercaptoetanol
- C. ^{33}P -ATP preparado diluyendo 1,0 μ l ^{33}P -ATP [10 mCi/ml] en 100 μ l de una solución madre 100 μ M stock de ATP no marcado
- D. Proteína básica de Mielina (350 μ g/ml, UBI) diluida en agua
- 15 E. PKC (50 ng/ml, UBI nº de catálogo 14-115) diluida en 0,5 mg/ml de BSA
- F. Solución de trabajo PKC/ Proteína básica de Mielina: Preparada mezclando 5 volúmenes de cada tampón de co-activación de PKC y Proteína básica de Mielina con 10 volúmenes de cada tampón de activación PKC y PKC.

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de ensayo de 96 pocillos profundos. Se añadió Inhibidor o vehículo (10 TI) a 5,0 μ l de ^{33}P -ATP. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de Solución de trabajo PKC/ Proteína básica de Mielina y mezclando. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 20 min. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de 50 TI de 100 mM EDTA y 100 mM de pirofosfato de sodio y mezclando. Se recogió Proteína básica de Mielina fosforilada sobre membranas PVDF en placas de filtro de 96 pocillos y se cuantificaron mediante recuento por centelleo.

Los compuestos de la presente invención descritos en los Esquemas y Tablas se ensayaron en el ensayo descrito anteriormente y se encontraron que tenían una CI_{50} de $\leq 50 \mu\text{M}$ contra una o más de Akt1, Akt2 y Akt3.

30

EJEMPLO 5

Ensayos basados en células para determinar la inhibición de Akt/PKB

Células (for ejemplo LnCaP o una línea celular tumoral PTEN^(-/-) Akt activada / PKB) se sembraron en placas de 100 mm. Cuando las células eran aproximadamente 70 a 80% confluentes, las células se volvieron a alimentar 5 ml de medio reciente y se añadió el compuesto de ensayo en solución. Los controles incluyeron células no tratadas, células tratadas con vehículo y células tratadas con o bien LY294002 (Sigma) o wortmanina (Sigma) una 20 μM o 200 nM, respectivamente. Las células se incubaron durante 2, 4 o 6 hrs, y se retiró el medio, las células se lavaron con PBS, se rasparon y se transfirieron a un tubo de centrifuga. Se sedimentaron y se

lavarón de nuevo con PBS. Finalmente, el sedimento celular se volvió a suspender en tampón de lisis (20 mM Tris pH8, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton, 1 mM pirofosfato de Na, 10 mM β -Glicerol Fosfato, 10 mM NaF, 0,5 mM NaVO_4 , 1 μM Microsistina, y 1x cóctel de inhibidor de proteasa), se colocaron en hielo durante 15 minutos y se agitó en aparato Vortex para lisar las células. El lisado se centrifugó en una ultracentrífuga de laboratorio Beckman a $100.000 \times g$ a 4°C durante 20min. La proteína sobrenadante se cuantificó mediante un protocolo Bradford convencional (BioRad) y se almacenó a -70°C hasta que fuera necesario.

Las proteínas se inmunoprecipitaron (IP) a partir de los lisados transparentes como sigue: para Akt1/PKBI, se mezclan los lisados con Santa Cruz sc-7126 (D-17) en NETN (100 mM NaCl, 20mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA, 0,5% NP-40) y se añadió Proteína A/G Agarosa (Santa Cruz sc-2003). Para Akt2/PKB β , se mezclaron los lisados en NETN con anti-Akt2 agarosa (Upstate Biotechnology n° 16-174) y para Akt3/PKBK, se mezclaron los lisados en NETN con anti-Akt3 agarosa (Upstate Biotechnology n° 16-175). Los IPs se incubaron durante toda una noche a 4°C , se lavaron y se separaron por SDS-PAGE.

Se usaron transferencias de para analizar el total de Akt, pThr308 Akt1, pSer473 Akt1, y sitios de fosforilación correspondientes sobre Akt2 y Akt3, y dianas cadena abajo de Akt usando anticuerpos específicos (Cell Signaling Technology): Anti-Total Akt (n° de catálogo 9272), Anti-Phospho Akt Serine 473 (n° de catálogo 9271), y Anti-fosfo Akt Treonina 308 (n° de catálogo 9275). Después de incubar con el anticurpo primario correspondiente se diluyó en PBS + 0,5% de leche en polvo no grasa (NFDM) a 4°C durante toda una noche, se alvaron las transferencias, se incubaron con peroxidasa de rábano picante (HRP)-anticuerpo secundario dirigido en PBS + 0,5% NFDM durante 1 hora a temperatura ambiente. Se detectaron las proteínas con reactivos ECL (Amersham/Pharmacia Biotech RPN2134).

EJEMPLO 6

Activación de la Akt estimulada por Heregulina

Células MCF7 (una línea de cáncer de mama humana que es PTEN^{+/+}) se sembraron a 1×10^6 células por placa de 100 mm. Cuando las células eran aproximadamente 70 a 80% confluentes, las células se volvieron a alimentar 5 ml de medio libre de suero y se incubaron durante toda una noche. A la mañana siguiente, el compuesto se añadió y las células se incubaron durante 1 - 2 hrs, después de ese tiempo se añadió heregulina (para inducir la activación de Akt) durante 30 minutos y se analizaron las células como se ha descrito anteriormente.

EJEMPLO 7

Inhibición de crecimiento de tumores

La eficacia in vivo de un inhibidor del crecimiento de las células de cáncer se puede confirmar por varios protocolos pocillo conocidos en la técnica.



Líneas celulares de tumores humanas que muestran una desregulación de la ruta PI3K (tales como LnCaP, PC3, C33a, OVCAR-3, MDA-MB-468, A2780 o similares) se inyectaron por vía subcutánea en el lado izquierdo de ratones (Harlan) hembras desnudas de 6 - 10 semanas de edad (también ratones macho [10 - 14 semanas de edad] se usan para xenotransplantes de tumores de próstata [LnCaP y PC3]) el día 0. Los ratones se asignan al azar a un grupo de vehículo, compuesto, o tratamiento de combinación. La administración subcutánea diaria comienza el día 1 y continua durante la duración del experimento. Como alternativa, el compuesto de ensayo inhibidor se puede administrar mediante una bomba de infusión continua. El compuesto, combinación de compuestos o vehículo se administra en un volumen total de 0,2 ml. Se retiran los tumores y se pesan cuando todos los animales tratados con vehículo muestran lesiones de 0,5 - 1,0 cm de diámetro, típicamente 4 a 5,5 semanas después de que se inyectaron las células. Se calcula el peso medio de los tumores en cada grupo de tratamiento para cada línea celular.

15

EJEMPLO 8

Ensayo Spot Multiplex

Este procedimiento describe un inmunoensayo de sándwich usado para detectar proteínas fosfoliladas múltiples en el mismo pocillo de una placa de formato de 96 pocillos. Los lisados celulares se incuban en placas de 96 pocillos sobre las que se colocan diferentes anticuerpos de captura en manchas distintas espacialmente en el mismo pocillo. Se añaden anticuerpos policlonales de conejo específicos de fosforilación y se detecta el complejo mediante un anticuerpo anti - conejo marcado con una marca de inmunofluorescencia.

Placas LNCaP +/- compuestos:

Centrifugar en Beckman J6 1200 rpm 10 min, aspirar el medio. Añadir 50µl/pocillo: TBS (Pierce nº 28376-20mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl) + 1% de Triton X-100 + Proteasa e inhibidores de Fosfatasa Inhibitors. Envolver en una envoltura de plástico, colocar en un congelador a -70°C hasta congelado completo. Bloquear las placas Multiplex (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) con 3% de Bloqueador A en 1X de tampón de lavado Tris, 150µl/pocillo. Cubrir con un sellador de placas, incubar en un agitador Micromix a T A 2 horas (mínimo). Lavar con 1X RCM 51 (TTBS). Descongelas las placas de lisado sobre hielo, añadir 40µl de lisado/pocillo en las placas bloqueadas. Cubrir con un sellador de placas, incubar en un agitador Micromix 4°C O/N, lavar con 1X RCM 51. Diluir los anticuerpos secundarios en 1% de Bloqueador A en 1X de tampón de lavado Tris: Anti fosfo AKT (T308), Anti fosfo Tuberina (T1462), solo o en combinación. Añadir 25µl/pocillo, cubrir con un sellador de placas, incubar en un agitador Micromix a T A 3 h. Lavar con 1X RCM 51. Diluir Ru-GAR en 1% Bloqueador A en 1X de tampón de lavado Tris. Añadir 25µl/pocillo, cubrir con un sellador de placas, incubar en un agitador Micromix a T A 1 h. Lavar con 1X RCM 51. Diluir con 4X detampón de lectura T hasya 1X con Agua, añadir 200µl de tampón de lectura diluido /pocillo

Leer en Sector 6000 Imager.

Inhibidores de Proteasa y Fosfatasa:

Microcystin-LR, Calbiochem n° 475815 a 1 μ M de concentración final (solución madre = 500 μ M)

- 5 Calbiochem n° 524624, 100X Set I
Calbiochem n° 524625, 100X Set II
Calbiochem n° 539134, 100X Set III

Anti Fosfo AKT (T308):

Cell Signaling Technologies n° 9275

- 10 Anti Fosfo Tuberina (T1462):

Covance Affinity Purified (Rabbits MS 2731/2732)

Ru-GAR = cabra anti conejo rutenilado

10X Tampón de lavado Tris, Bloqueador A y 4X de Tampón de lectura T

10X RCM 51 (10X TTBS, RCM 51)

- 15 1X = 20 mM Tris pH 7,5, 140mM NaCl, 0,1% Tween-20

EJEMPLO 9

Ensayo basado en células (In-vivo)

- 20 Este procedimiento describe un ensayo de actividad basado en células (in vivo) para la Akt serina/treonina quinasa. La Akt activada endógena es capaz de fosforilar un péptido de sustrato de Akt específico (GSK3 β) que está biotinilado. La detección se realiza mediante Fluorescencia de Resolución Temporal Homogénea (HTRF) usando un anticuerpo acoplado a Europium Kryptate [Eu(K)] específico para el fosfopéptido y fluorofóro XL665 unido a estreptavidina que se unirá al resto de biotina en el péptido. Cuando el [Eu(K)] y XL665 están en proximidad (es decir, unido a la misma molécula de fosfopéptido) tiene lugar una transferencia de energía no radiactiva a partir del Eu(K) al XL665, seguido de emisión de luz de XL665 a 665 nm.

- 25 El ensayo se puede usar para detectar inhibidores de las tres isozimas de Akt (Akt1, Akt2, y Akt3) de especies diferentes múltiples si existen anticuerpos para cada uno.

30

MATERIALES y REACTIVOS

- A. Placas de 96 pocillos de fondo plano de microvaloración de cultivo celular, Corning Costar, N° de catálogo 3598
- 35 B. Placas de 96 pocillos recubiertas con Reacti-Bind Proteína A, Pierce, n° de Catálogo 15130.
- C. Placas de 96 pocillos recubiertas con Reacti-Bind Proteína G, Pierce, N° de catálogo 15131.
- D. Agitador Micromix 5.

125

E. Placas de microtitulación de fondo en U Microfluor®B, Dynex Technologies, N° de catálogo 7205.

F. Lavador de placas de 96 Pocillos, Bio-Tek Instruments, N° de catálogo EL 404.

G. Analizador de microplacas Discovery® HTRF, Packard Instrument Company.

5 SOLUCIONES TAMPÓN

A. Tampón de lisis de células de IP Quinasa: 1X de TBS; 0,2% de Tween 20; 1X de cóctel inhibidor de proteasa III (la solución madre es 100X, Calbiochem, 539134); 1X cóctel inhibidor de fosfatasa I (la solución madre es 100X, Calbiochem, 524624); y 1X cóctel inhibidor de fosfatasa I II (la solución madre es 100X, Calbiochem, 524625).

10 B. 10X de Tampón de ensayo: 500 mM Hepes pH 7,5; 1% PEG; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; y 20 mM β -glicerofosfato.

C. Tampón de ensayo IP Quinasa: 1X de Tampón de ensayo; 50 mM KCl; 150 μ M ATP; 10 mM $MgCl_2$; 5% Glicerol; 1 mM DTT; 1 comprimido de cóctel inhibidor de Proteasa por 50 ml de Tampón de ensayo; y 0,1% de BSA

15 D. Solución de sustrato GSK3 β : Tampón de ensayo IP Quinasa; y 500 nM de péptido GSK3 β biotinilado.

E. Tampón Lance: 50 mM Hepes pH 7,5; 0,1% BSA; y 0.1% de Triton X-100.

F. Tampón de detención Lance: Tampón Lance; y 33,3 mM EDTA.

20 G. Tampón de detección Lance: Tampón Lance; 13,3 μ g/ml SA-APC; y 0,665 nM EuK Ab a-fosfo (Ser-21) GSK3 β

Ensayo de Akt Quinasa Immunoprecipitación Multi-Etapa

Día 1

A. Etapa de siembra de células C33a: Sembrar 60.000 células C33a /pocillo en una placa de microvaloración de 96 pocillos.

25 B. Incubar las células durante toda una noche a 37°C.

Día 2

D. Etapa de adición de compuestos: Añadir los compuestos en medio reciente (alfa-MEM/10% FBS, temperatura ambiente) a una placa de 96 pocillos de antes e incubar durante 5 hrs en un incubador de cultivo de tejidos.

30 E. Etapa de lisis celular: Aspirar el medio y añadir 100 μ l de Tampón de lisis celular de IP Quinasa.

F. Congelar la placa de microvaloración de 96 pocillos a -70°C (NOTA: Esta etapa se puede hacer durante un mínimo de 1 hora o durante toda una noche.)

Día 3

35 G. Etapa de placa de placa de 96 pocillos revestida con Proteína A/G: Añadir una concentración apropiada de anticuerpo de α -Akt (Akt1, Akt2, o Akt3) en 100 μ l de PBS a los siguientes pocillos:

176

Akt1 α -Akt 1 (20 ng/pocillo/100ul) B2 >>>>>> B10 / filas B - G / placa

Akt2 α -Akt 2 (50 ng/pocillo/100ul) B2 >>>>>> B10 / rows B - G / placa

5 Conejo-IgG (150 ng/pocillo/100 ul): B11 - G11 en cada placa (Akt1 y Akt2)

H. Incubar en una habitación fría (+ 4°C) durante 4 horas en el Micromix 5 (Forma 20; Posición 2) (NOTA: La posición depende de la máquina Micromix 5).

I. Retirar por aspiración la solución del anticuerpo α -Akt y añadir 100 μ l de PBS a cada pocillo.

10 J. Etapa de inmunoprecipitación de la Akt: A los 100 μ l de PBS de la etapa (I) añadir 5 μ l de lisado celular descongelado para las placas de Akt1 y 10 μ l de lisado celular descongelado para las placas Akt2. NOTA: Descongelar el lisado celular en hielo. Mezclar el lisado celular en hielo. Mezclar el lisado descongelado pipeteando arriba y abajo 10 veces antes de transferir a las placas de anticuerpo. Mantener las placas de lisado de células en hielo. Después de transferir el lisado de células a las placas de anticuerpo volver a congelar el lisado de células a - 70°C.

15 K. Incubar en la habitación fría (+ 4°C) durante toda una noche en el agitador Micromix 5 (forma 20, posición 3).

Día 4

20 L. Etapa de lavado de placas de inmunoprecipitación: lavar las placas de 96 pocillos 1X con TTBS (RCM 51, 1X = 2 ciclos) usando el lavador de placas de 96 Pocillos. Llenar los pocillos con TTBS e incubar durante 10 minutos. Lavar las placas de 96 pocillos 2X con TTBS. (NOTA: Cebat el lavador de placas antes de uso: 1. Comprobar los depósitos de tampón, estar seguro que están llenos y 2. vaciar los recipientes de desecho.

M. Manual Plate Wash Step: Add 180 μ l de IP Quinasa Tampón de ensayo.

25 N. Comienzo de la reacción de la enzima Akt: Aspirar el sobrenadante. Añadir 60 μ l de solución de sustrato GSK3 β .

O. Incubar durante 2,5 horas en el agitador Micromix 5 @ T A. NOTA: El tiempo de incubación se debe ajustar de manera que la relación de la Columna 10 /Columna 11 no sea > 10.

30 P. Combinar 30 μ l de tampón de detección Lance con 30 μ l de tampón de detención Lance (60 μ l total/pocillo) y añadir a las placas de 96 pocillos de fondo en U Microfluor.

Q. Detener la reacción enzimática de Akt: Transferir 40 μ l de la mezcla de reacción de la enzima Akt de la placa de 96 pocillos de Proteína A/G 96 de la Etapa (O) a las placas de 96 pocillos de fondo en U Microfluor U de la Etapa (P).

35 U. Incubar a temperatura ambiente durante 1 - 2 hrs en el agitador Micromix 5 (forma 20, posición 3), después leer con el analizador de microplacas Discovery HTRF usando el programa Akt.

Tampón de lisis celular de IP Quinasa

122

100 µl por pocillo

	8 ml (1 Placa)		45 ml (6 Placas)
1X de TBS	7744 µl		N D
Tween 20	20 µl		N D
1X de cóctel inhibidor de proteasa III	80 µl		N D 450 µl
1X Cóctel Inhibidor de fosfatasa I	80 µl		450 µl
1X Cóctel Inhibidor de fosfatasa II	80 µl		450 µl
Microcistina LR (500X)			90 µl

Tampón de ensayo de IP Quinasa

100 µl por pocillo

	8 ml (1 Placa)		50 ml (3 Placas)
10X de tampón de ensayo	800 µl		5 ml
1 M KCl	400 µl		2.5 ml
250 mM ATP	4.8 µl		30 µl
1M MgCl ₂	80 µl		500 µl
Glicerol	400 µl		2.5 ml
1M DTT	8 µl		50 µl
Cóctel Inhibidor de proteasa	1 comprimido/50 ml		1 500 µl
10% BSA	80 µl		38,9 ml
di dH ₂ O	6227,2 µl		

Solución de sustrato GSK3β

5 60 µl por pocillo

	5 ml (1 Placa)		7 ml
Tampón de ensayo de IP Quinasa	5 ml		-
1 mM de péptido GSK3β	2,5 µl		3,5 µl

Tampón de detención Lance Stop Buffer

30 µl por pocillo

	3 ml (1 Placa)	5 ml	5 ml
--	-------------------	------	------

1X de tampón Lance EDTA 0,5 M	2800.2 μ l 199,8 μ l		
----------------------------------	---------------------------------	--	--

Tampón de detección Lance30 μ l por pocillo

	3 ml (1 Placa)		5 ml
SA-APC (1 mg/ml in ddH ₂ O, diluir 1/75,2 en tampón Lance)	40 μ l		66,7 μ l
EuK Ab α -fosfo (Ser 21)GSK3 β (680 nM, diluir 1/1133 en tampón Lance)	2,7 μ l		4,5 μ l

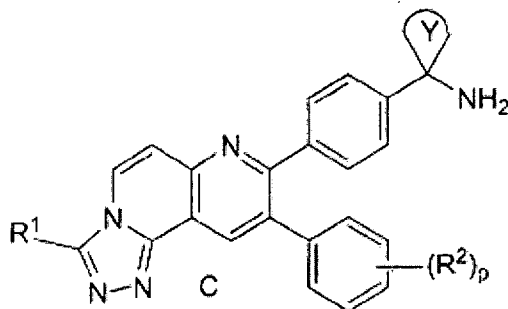
5

10

mg

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula C:



5

en la que:

a es 0 ó 1; b is 0 ó 1; m is 0, 1 ó 2; p es 0, 1 ó 2;

R² se selecciona independientemente entre: alquilo (C₁-C₆), alcoxi (C₁-C₆), CO₂H, halo, OH y NH₂;

10

El anillo Y es cicloalquilo (C₄-C₇);

R¹ se selecciona entre: H, oxo, (C=O)_aO_balquilo (C₁-C₁₀), (C=O)_aO_b-arilo, (C=O)_aO_b alqueno (C₂-C₁₀), (C=O)_aO_b alquino (C₂-C₁₀), CO₂H, halo, OH, O_b perfluoroalquilo (C₁-C₆), (C=O)_aNR⁷R⁸, CN, (C=O)_aO_b cicloalquilo (C₃-C₈), S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-alquilo (C₁-C₁₀) y (C=O)_aO_b-heterociclilo, dicho alquilo, arilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, y heterociclilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R⁶;

15

R⁶ es: (C=O)_aO_b alquilo C₁-C₁₀, (C=O)_aO_barilo, alqueno C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, (C=O)_aO_b heterociclilo, CO₂H, halo, CN, OH, O_b perfluoroalquilo C₁-C₆, O_a(C=O)_bNR⁷R⁸, oxo, CHO, (N=O)R⁷R⁸, S(O)_mNR⁷R⁸, SH, S(O)_m-alquilo (C₁-C₁₀) o (C=O)_aO_b cicloalquilo C₃-C₈, dicho alquilo, arilo, alqueno, alquino, heterociclilo, y cicloalquilo opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a};

20

R^{6a} se selecciona entre: (C=O)_aO_b alquilo (C₁-C₁₀), O_a perfluoroalquilo (C₁-C₃), alqueno (C₀-C₆)-S(O)_mR^a, SH, oxo, OH, halo, CN, alqueno (C₂-C₁₀), alquino (C₂-C₁₀), cicloalquilo (C₃-C₆), alqueno (C₀-C₆)-arilo, alqueno (C₀-C₆)-heterociclilo, alqueno (C₀-C₆)-N(R^b)₂, C(O)R^a, alqueno (C₀-C₆)-CO₂R^a, C(O)H, y alqueno (C₀-C₆)-CO₂H, dicho alquilo, alqueno, alquino, cicloalquilo, arilo, y heterociclilo está opcionalmente sustituido con up to tres sustituyentes seleccionados entre R^b, OH, alcoxi (C₁-C₆), halógeno, CO₂H, CN, O_a(C=O)_b alquilo (C₁-C₆), oxo, y N(R^b)₂;

25

R⁷ y R⁸ se seleccionan independientemente entre: H, (C=O)_aO_b alquilo (C₁-C₁₀), (C=O)_aO_b cicloalquilo (C₃-C₈), (C=O)_aO_b-arilo, (C=O)_aO_b-heterociclilo, alqueno (C₂-

30

30

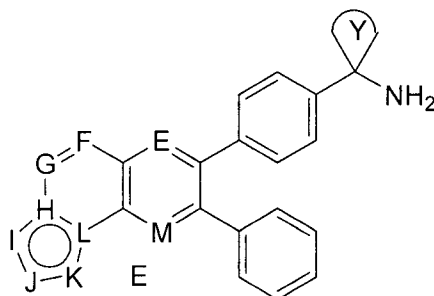
C₁₀), alquino (C₂-C₁₀), SH, SO₂R^a, y (C=O)_aNR^b₂, dicho alquilo, cicloalquilo, arilo, heterociclilo, alqueno, y alquino está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a}, o R⁷ y R⁸ se pueden tomar juntos con el nitrógeno al que están unidos para formar a heterociclo monocíclico o bicíclico con 3 - 7 miembros en cada anillo conteniendo
 5 opcionalmente, además del nitrógeno, uno o dos heteroátomos adicionales seleccionados entre N, O y S, dicho heterociclo monocíclico o bicíclico opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes seleccionados entre R^{6a};

R^a es alquilo (C₁-C₆), cicloalquilo (C₃-C₆), arilo, o heterociclilo; y

R^b es independientemente: H, alquilo (C₁-C₆), arilo, heterociclilo, cicloalquilo
 10 (C₃-C₆), (C=O)_aO_b alquilo (C₁-C₆), o S(O)_mR^a;
 o una sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable de los mismos.

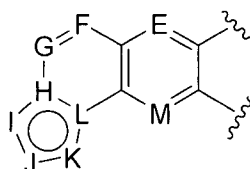
2. Un compuesto de acuerdo con la Fórmula E, en la que:

15



20

en la que:

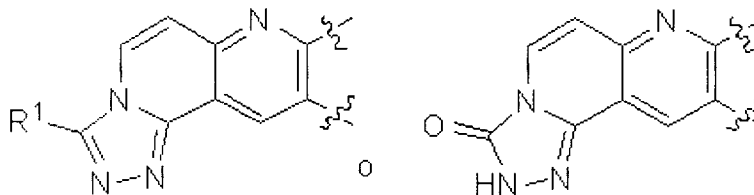


25

es

30

B1



el anillo Y es ciclobutilo;

R¹ es H, pirimidilo, metilimidazol, OH, metilo o ciclopropilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

3. Un compuesto que es:

Diclorhidrato de 1-{4-[3-(1-metil-1*H*-imidazol-4-il)-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-

1,6-naftiridin-8-il]fenil}ciclobutanamina;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

4. Un compuesto que es:

1-[4-(9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutil} carbamato de
terc-butilo;

15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5. Un compuesto que es:

1-[4-(9-fenil-3-pirimidin-2-il-[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

6. Un compuesto que es:

8-[4-(1-aminociclobutil)fenil]-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-*f*]-1,6-naftiridin-3-ona;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25



7. Un compuesto que es:

1-[4-(3-metil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

8. Un compuesto que es:

1-[4-(3-ciclopropil-9-fenil[1,2,4]triazolo[3,4-f]-1,6-naftiridin-8-il)fenil]ciclobutanamina;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

9. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico, y dispersado en ella, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1.

15

10. El uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero en necesidad de tal tratamiento.

20



RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

- La presente invención proporciona compuestos de naftiridina sustituidos que inhiben la actividad de la Akt. En particular, los compuestos descritos inhiben de manera selectiva una o dos de las isoformas de la Akt. La invención también proporciona composiciones
- 5 que comprenden tales compuestos inhibidores y procedimientos de inhibición de la actividad de la Akt mediante la administración del compuesto a un paciente en necesidad de tratamiento de cáncer.

BY

SEQUENCE LISTING

<110> Merck & Co., Inc.
Kelly, Michael J., III
Layton, Mark E.
Sanderson, Philip E.

<120> INHIBITORS OF AKT ACTIVITY

<130> 22304YS

<150> 60/873,198

<151> 2006-12-06

<150> 60/880,661

<151> 2007-01-16

<150> 60/967,872

<151> 2007-09-06

<160> 16

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 1

ctgcggccgc

10

<210> 2

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 2

gtacgcggcc gcag

14

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 3
cgcgattca gatctaccat gagcgacgtg gctattgtg 39

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 4
cgctctagag gatcctcagg ccgtgctgct ggc 33

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 5
gtacgatgct gaacgatatc ttcg 24

<210> 6
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 6
gaatacatgc cgatggaaag cgacggggct gaagagatgg aggtg 45

<210> 7
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 7
ccccccatc tcttcagccc cgctcgtttc catcggcatg tattc 45

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 8

MS

gaattcagat ctacccatgag cgatgttacc attgtg 36

<210> 9
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 9
 tctagatcctt attctcgtcc acttgcagag 30

<210> 10
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 10
 ggtaccatgg aatacatgcc gatggaaagc gatgttacca ttgtgaag 48

<210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 11
 aagcttagat ctacccatgaa tgaggtgtct gtc 33

<210> 12
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 12
 gaattcggat cctcactcgc ggatgctggc 30

<210> 13
 <211> 49
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Completely Synthetic DNA Sequence

<400> 13
 ggtaccatgg aatacatgcc gatggaaaat gaggtgtctg tcatcaaag 49

36

<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic Amino Acid Sequence

<400> 14
Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic Amino Acid Sequence

<400> 15
Gly Gly Arg Ala Arg Thr Ser Ser Phe Ala Glu Pro Gly
1 5 10

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Completely Synthetic Amino Acid Sequence

<400> 16
Lys Lys Gly Gly Arg Ala Arg Thr Ser Ser Phe Ala Glu Pro Gly
1 5 10 15

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 June 2008 (12.06.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/070041 A2

(51) International Patent Classification: **Not classified**

(21) International Application Number:

PCT/US2007/024772

(22) International Filing Date:

3 December 2007 (03.12.2007)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

60/873,198 6 December 2006 (06.12.2006) US

60/880,661 16 January 2007 (16.01.2007) US

60/967,872 6 September 2007 (06.09.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK & CO., INC.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **KELLY, Michael, J., III** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **LAYTON, Mark, E.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US). **SANDERSON, Philip, E.** [GB/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(74) Common Representative: **MERCK & CO., INC.**; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

WO 2008/070041 A2

(54) Title: INHIBITORS OF AKT ACTIVITY

(57) Abstract: The instant invention provides for substituted naphthyridine compounds that inhibit Akt activity. In particular, the compounds disclosed selectively inhibit one or two of the Akt isoforms. The invention also provides for compositions comprising such inhibitory compounds and methods of inhibiting Akt activity by administering the compound to a patient in need of treatment of cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/024772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07D401/04 C07D401/06 C07D403/04 C07D403/06 C07D407/04
C07D409/04 C07D413/04 C07D417/04 C07D471/14 A61K31/4353
A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2006/036395 A (MERCK & CO INC [US]; BILODEAU MARK T [US]; COSFORD NICHOLAS D P [US];) 6 April 2006 (2006-04-06) pages 1,50; compound 1.5 -----	1-10
A	WO 2004/096130 A (MERCK & CO INC [US]; BILODEAU MARK T [US]; WU ZHICAI [US]) 11 November 2004 (2004-11-11) pages 1,35; compound 1.7 -----	1-10
A	EP 1 679 308 A (UBE INDUSTRIES [JP]; SANTEN PHARMA CO LTD [JP]) 12 July 2006 (2006-07-12) page 14, paragraph 3 -----	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 July 2008

Date of mailing of the international search report

15/07/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bourghida, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/024772

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006036395 A	06-04-2006	AU 2005290081 A1	06-04-2006
		CA 2576172 A1	06-04-2006
		EP 1784175 A2	16-05-2007
		JP 2008510823 T	10-04-2008
WO 2004096130 A	11-11-2004	AU 2004233827 A1	11-11-2004
		CA 2522430 A1	11-11-2004
		CN 1809351 A	26-07-2006
		EP 1620095 A2	01-02-2006
		JP 2006524254 T	26-10-2006
EP 1679308 A	12-07-2006	CA 2542609 A1	21-04-2005
		WO 2005035506 A1	21-04-2005
		KR 20060128857 A	14-12-2006
		US 2007129404 A1	07-06-2007



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-054952- -00000-0000

Fecha: 2009-05-28 16:20:20

Dep. 2020 NUECREACIONE

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 140

io
A

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- ◇ Indicación de que se solicita la concesión de una patente []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Descripción de la invención []
- ◇ Dibujos de ser estos pertinentes []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◇ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◇ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◇ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◇ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10'
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
MERCK & CO INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 54952
	Solicitud internacional	PCT/US2007/024772
	Fecha inicio fase nacional	06/07/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	

9232

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 14 AGO. 2009
jfernand

142