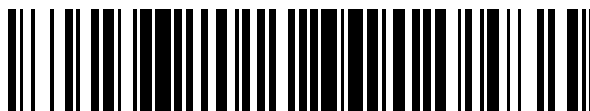


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 891**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/4745** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2012 E 12701207 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2663564**

54 Título: **Compuesto imidazo[4,5-C]quinolin-2-ona y su uso como inhibidor dual de PI3 quinasa / mTOR**

30 Prioridad:

**14.01.2011 US 201161432958 P**

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

**20.03.2015**

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)  
Lilly Corporate Center  
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

**BARDA, DAVID ANTHONY y  
MADER, MARY MARGARET**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 531 891 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuesto imidazo[4,5-C]quinolin-2-ona y su uso como inhibidor dual de PI3 quinasa / mTOR.

5 Las fosfoinositida 3-quinasas (PI3K) son una familia de lípido quinasas que propagan cascadas de señalización intracelular que regulan un amplio intervalo de procesos celulares. Por ejemplo, la activación de la PI3K inicia una cascada de transducción de señales que promueve el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo de células cancerosas. La diana en mamíferos de la rapamicina (mTOR) es un nodo de señalización clave que coordina el progreso del ciclo celular y el crecimiento celular en respuesta a condiciones genéticas, epigenéticas y ambientales. Las rutas involucradas en la señalización por mTOR están desreguladas en los tejidos humanos precancerosos. En vista de los papeles que mantienen PI3K y mTOR en las rutas cíclicas celulares, la inhibición tanto de PI3K como de mTOR puede ser útil en el tratamiento de ciertas enfermedades humanas, tales como cáncer.

10 En la técnica se conocen inhibidores de PI3K e inhibidores duales de PI3K/mTOR. El documento WO 2010/038165 desvela ciertos compuestos de imidazo[1,5]naftiridina que afirman ser moduladores o inhibidores de la enzima PI3-K $\alpha$  y/o inhibidores duales de PI3-K $\alpha$ /mTOR. Los documentos WO 2010/139731 y WO 2010/139747 desvelan ciertos compuestos de imidazoquinolinona afirmados para el uso en el tratamiento de enfermedades dependientes de proteína o lípido quinasas, particularmente de enfermedades dependientes de PI3K.

15 Se mantiene una necesidad de proporcionar inhibidores de PI3K/mTOR alternativos, particularmente fuertes inhibidores de PI3K/mTOR con propiedades físicas beneficiosas, tales como solubilidad mejorada y/o propiedades clínicas deseables, tales como fuerza *in vivo* mejorada y/o funcionamiento farmacocinético que pueden usarse en el tratamiento de trastornos de células proliferativas tales como cáncer. La presente invención proporciona fuertes inhibidores de PI3K/mTOR. Más particularmente, la presente invención proporciona fuertes inhibidores de PI3K/mTOR con propiedades físicas beneficiosas y/o propiedades clínicas deseables que son útiles como agentes contra el cáncer.

La presente invención proporciona un compuesto que es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

25 Como una realización particular, la presente invención proporciona el compuesto que es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona.

Otra realización es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona en forma cristalina.

30 La presente invención también proporciona 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona en forma cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos-X de polvo que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que tienen lugar en 8,57 y uno o más de 9,06, 15,93, 18,29 y 18,87.

35 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, que comprende adicionalmente uno o más principios terapéuticos.

40 La presente invención proporciona un procedimiento para tratar el cáncer, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona el uso de 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

45 La presente invención proporciona 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para usar en terapia.

La presente invención proporciona 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento del cáncer.

50 Además, la presente invención proporciona realizaciones preferidas de los procedimientos y usos como se describen en el presente documento, en que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, NSCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer renal, sarcoma, cáncer de tejido hematopoyético y linfoide, cáncer del SNC,

cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer de tiroides, cáncer del tracto aerodigestivo superior y cáncer urinario.

Como se usa anteriormente, y a lo largo de toda la descripción de la presente invención, los siguientes términos, salvo que se indique lo contrario, deberían entenderse que tienen los siguientes significados:

- 5 “Sal farmacéuticamente aceptable” o “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a las sales relativamente no tóxicas, inorgánicas y orgánicas de los compuestos de la presente invención.

Las expresiones “tratamiento”, “tratar”, “tratando” y similares, se entiende que incluyen ralentizar o invertir el progreso de un trastorno. Estas expresiones también incluyen aliviar, mejorar, atenuar, eliminar o reducir uno o más síntomas de un trastorno o afección, incluso si el trastorno o la afección no se han eliminado realmente e incluso si el progreso del trastorno o de la afección no está en sí mismo ralentizado o invertido.

10 “Cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” significa la cantidad del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la presente invención o composición farmacéutica que contiene un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, de la presente invención que provocará la respuesta biológica o médica de o un efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está buscando el investigador, el veterinario, el médico tratante u otro especialista clínico.

Los compuestos de la presente invención tienen la capacidad de reaccionar, por ejemplo, con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, *por ejemplo*, P. Stahl, et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, et al., “Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, N° 1, enero de 1977.

Los compuestos de la presente invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas que usan uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables y se administran por una diversidad de vías. Preferentemente, tales composiciones son para administración oral, subcutánea o intravenosa. En la técnica se conocen bien tales composiciones farmacéuticas y los procedimientos para prepararlas. Véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21ª Edición, Mack Publishing Co., 2005).

La cantidad de compuesto de la presente invención realmente administrada la determinará un médico en función de las circunstancias relevantes, incluyendo la afección que vaya a tratarse, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado de la presente invención, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual y la gravedad de los síntomas del paciente. Las dosis por día normalmente se encuentran en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2000 mg. En algunos ejemplos los niveles de dosis por debajo del límite inferior del intervalo anteriormente mencionado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos pueden emplearse dosis incluso mayores.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, así como aquellos descritos en las Preparaciones y Ejemplos que se indican más adelante. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes formas para preparar los compuestos de la presente invención.

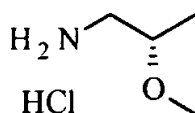
Los reactivos y los materiales de partida generalmente se encuentran fácilmente disponibles para un experto en la materia. Otros pueden fabricarse por técnicas convencionales de química orgánica y heterocíclica, técnicas que son análogas a las síntesis de compuestos conocidos estructuralmente similares y los procedimientos descritos en las Preparaciones y Ejemplos indicados más adelante, incluyendo cualquier procedimiento nuevo. Las siguientes Preparaciones y Ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención con detalle adicional y representan las síntesis típicas de los compuestos. Los nombres de los compuestos de la presente invención se proporcionan generalmente por SymyxDraw 3.2.

45 Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: “ATP” se refiere a adenosín trifosfato; “ABC” se refiere al área bajo la curva, “SNC” se refiere a sistema nervioso central, “DMEM” se refiere a medio de Eagle modificado por Dulbecco; “DMSO” se refiere a dimetilsulfóxido; “DTT” se refiere a ditiotreitól; “4E-BP1” se refiere a la proteína 1 de unión a 4E; “FBS” se refiere a suero bovino fetal; “EDTA” se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; “EGTA” se refiere a ácido etilenglicol-bis (â-amino etiléter) - N, N, N', N' - tetraacético; “GFP” se refiere a proteína fluorescente verde; “GST” se refiere a glutatión-S-transferasa; “HEC” se refiere a hidroxietilcelulosa; “HEPES” se refiere a ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico; “HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; “CI<sub>50</sub>” se refiere a la concentración inhibitoria media máxima; “IMDM” se refiere a Medio de Dulbecco Modificado por Iscove; “MEM” se refiere a Medio Esencial Mínimo; “EM” se refiere a espectrometría de masas, “RMN” se refiere a resonancia magnética nuclear; “NSCLC” se refiere a cáncer pulmonar no microcítico; “PBS” se refiere a solución salina tamponada con fosfato; “PGK” se refiere a fosfoglicerato quinasa; “PIP<sub>2</sub>” se refiere a fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato; “PO” se refiere a por vía oral; “POPS” se refiere a fosfatidilserina de palmitoil-oleoil; “PPI” se refiere a inhibidor de la bomba de protones; “RPMI” se refiere al Roswell Park Memorial

Institute; "TA" se refiere a temperatura ambiente; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "TMED50" se refiere a dosis eficaz mínima umbral; "TR-FRET" se refiere a transferencia de energía fluorescente resuelta en tiempo; "Tris" se refiere a tris(hidroximetil) aminometano; "Triton-X" se refiere a éter de 4-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)fenil-poli(etilenglicol t-octilfenoxipolietoxietanol polietilenglicol *terc*-octilfenilo; y "Tween-20" se refiere a polisorbato 20; "XRD" se refiere a difracción de Rayos-X de polvo.

## Preparación 1

Clorhidrato de (2S)-2-metoxipropan-1-amina

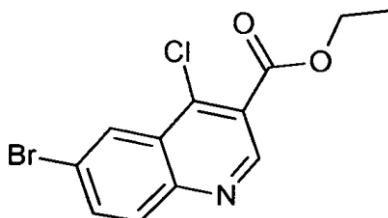


10 Enfriar una disolución de [(2S)-2-hidroxiopropil]carbamato de *terc*-butilo (870 g, 4,96 mol) en tetrahidrofurano (10 l) a 5 °C. Añadir hidruro sódico (dispersión del 60 %, 248 g, 6,21 mol, 1,25 eq.) en porciones durante 8 minutos. Agitar la reacción a 5 °C, durante 30 minutos. Añadir yoduro de metilo (387 ml, 6,21 mol, 1,25 eq.) gota a gota durante 5 minutos y permitir que la reacción proceda a 5-10 °C durante 45 minutos. Interrumpir la reacción con agua (1 l) y extraer con acetato de etilo (4 l). Obtener la capa orgánica y concentrarla al vacío para obtener un resto. Co-  
15 evaporar el resto con tolueno (2 x 1 l), diluir con diclorometano (2 l) y filtrar. Aclarar el sólido que queda con diclorometano adicional (500 ml). Concentrar el filtrado líquido combinado con diclorometano al vacío para obtener un intermedio bruto de N-[(2S)-2-metoxipropil]carbamato de *terc*-butilo (880 g, 94 %).

Suspender el intermedio bruto N-[(2S)-2-metoxipropil]carbamato de *terc*-butilo (806 g, 4,26 mmol) en diclorometano (3,22 l) y añadir HCl 4 M en dioxano (2,66 l) gota a gota a 15 °C durante 30 minutos. Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante 2 horas. Filtrar y lavar el resto sólido con diclorometano adicional (2 x 250 ml) y eliminar los volátiles al vacío para dar un precipitado sólido. Añadir éter de metil *terc*-butilo (2 l) al sólido y filtrar; lavar el sólido con éter de metil *terc*-butilo adicional (2 x 500 ml), secar y lavar adicionalmente el sólido con acetona (4 x 500 ml) para obtener un sólido blanco como el compuesto titulado (171 g, 32 %). 1H RMN (300,13 MHz, DMSO): 8,11 (s, 3H), 3,62-3,55 (m, 1H), 3,26 (s, 3H), 2,87 (dd, J= 3,6, 13,2 Hz, 1H), 2,68 (dd, J= 8,5, 13,2 Hz, 1H), 1,10 (d, J= 6,3 Hz, 3H).

## 25 Preparación 2

6-Bromo-4-cloro-quinolin-3-carboxilato de etilo



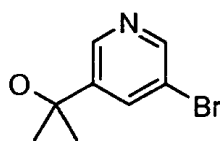
30 Suspender etil éster de ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolin-3-carboxílico (11 g, 37 mmol) en dimetilformamida anhidro (148,6 ml) en atmósfera de nitrógeno. Añadir cloruro de fosforilo (20,7 ml, 222 mmol, 6 eq.) a través de una jeringa durante 5 minutos y agitar vigorosamente a temperatura ambiente durante 3 horas. Interrumpir la reacción vertiendo la reacción en agua helada (1,5 l) y continuar agitando hasta que todo el hielo se haya derretido. Obtener el sólido formado por filtración, aclarar con agua y permitir el secado completo para producir el compuesto titulado (11,4 g, 94 %). EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 314,0, 316,0.

35 Alternativamente, preparar etil éster de ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolin-3-carboxílico como sigue y usar en la preparación del compuesto titulado. Disolver 2-(((4-bromofenil)amino)metil)malonato de dietilo (25,6 g, 74,8 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (107 ml) y transferir a una bomba. Después, la bomba suministra entre 19 y 21 ml de esta disolución a un reactor de 25 ml entre 240 °C y 260 °C en nitrógeno entre 3,96 a 4,83 MPa para permanecer por encima de la presión de vapor de la disolución de reactivo. Después, entre 60 y 180 minutos a esta temperatura, la suspensión resultante sale del reactor a través de una válvula mediante un tubo de inmersión cerca del fondo del reactor a una zona de despresurización y enfriamiento de 10 ml. Finalmente, una segunda válvula en serie envía la suspensión a un filtro de presión en línea. Esta secuencia para vaciar el reactor se repite 2 veces más antes de rellenar el reactor como se describe anteriormente para asegurar que la suspensión residual se elimina a un volumen mínimo y para proporcionar presión de nitrógeno al filtro de placa única. El ciclo automatizado continúa repetidamente y los sólidos se acumulan con el tiempo en el mismo filtro de placa única. Si el ciclo de producción se hace durante muchos días, se usarían al menos 2 filtros en paralelo, para que el filtro fuera de línea pueda lavarse y eliminar los sólidos sin parar el reactor de flujo intermitente. Después de que se realicen unos 5 ciclos adicionales de esta manera se envía 2-metiltetrahidrofurano (20 ml) al reactor y se transfiere al filtro. Este modo de funcionamiento puede denominarse flujo intermitente semi-continuo o en lotes automatizado secuenciado. De  
45

5 cualquier manera, los aspectos de este modo de funcionamiento que lo hacen similar a la reacción continua son que la temperatura y la presión del reactor no cambian con el tiempo pero siempre se mantienen en las condiciones de reacción, los tiempos de calentamiento y enfriamiento son muy rápidos para los reactivos que fluyen hacia el reactor y el producto que fluye fuera del reactor, los tiempos de calentamiento más enfriamiento son escalables, y los  
 10 tiempos de residencia de los reactivos y los productos en el recipiente de reacción son los mismos en todas las escalas controlando los flujos de entrada y de salida y la capacidad de calentar/enfriar externa al reactor. Después de secar, se recoge el etil éster de ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolin-3-carboxílico (4,66 g, 21 %). Los filtrados resultantes ricos en 2-(((4-bromofenil)amino)metileno)malonato de dietilo se concentran para eliminar el etanol rindiendo 7,8 g y reconstituido en 2-metiltetrahidrofurano. Una porción de este material (4,8 g) vuelve a someterse a  
 15 las condiciones de reacción y se recoge etil éster de ácido 6-bromo-4-hidroxiquinolin-3-carboxílico adicional (0,56 g) para un rendimiento global del 25 %. <sup>1</sup>H-RMN: (399,84 MHz, TFA-*d*), δ (ppm): 1,52 (3H, t, *J* = 7,04 Hz), 4,67 (2H, q, *J* = 7,03 Hz), 8,03 (1H, d, *J* = 8,79 Hz), 8,28 (1H, d, *J* = 8,79 Hz), 8,80 (1H, s), 9,32 (1H, s); <sup>13</sup>C RMN (100,54 MHz, TFA-*d*), δ (ppm): 11,9, 64,7, 105,3, 121,0, 121,2, 124,9, 126,9, 137,9, 141,1, 145,0, 167,2, 172,4.

## Preparación 3

15 2-(5-Bromo-3-piridil)propan-2-ol



## procedimiento 1

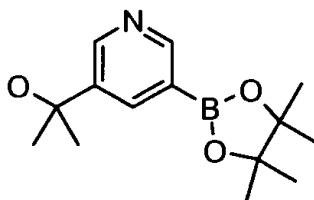
Añadir una solución de 5-bromopiridin-3-carboxilato de etilo (22,5 g, 98 mmol) en tetrahidrofurano (350 ml) a una  
 20 disolución de bromuro de metilmagnesio 3 M en éter de dietilo (98 ml, 293 mmol, 3 eq.) con una temperatura interna por debajo de 30 °C. Tras la finalización de la reacción, enfriar la mezcla en un baño de hielo e interrumpir con cloruro de amonio acuoso saturado y seguir agitando hasta que la mayoría de los sólidos se disuelva. Añadir agua (500 ml) y extraer con acetato de etilo (3 x 500 ml). Secar la capa orgánica sobre sulfato de sodio, filtrar y concentrar la capa orgánica a un resto. Purificar el resto por cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con disolvente de acetato de etilo: hexano (1:1), para producir el producto titulado como un aceite (19,4 g, 92 %). EM (ESI) *m/z* (*M* + *H*)<sup>+</sup> 214,9, 216,9.

## procedimiento 2

Añadir una disolución de 5-bromopiridin-3-carboxilato de metilo (173 g, 800 mmol) en tetrahidrofurano (2,6 l) gota a  
 30 gota a una disolución de bromuro de metilmagnesio 3 M en éter de dietilo (800 ml, 3,0 eq.) durante 30 minutos en un baño de enfriamiento con una temperatura interna por debajo de 18 °C. Agitar la mezcla a temperatura ambiente durante una hora, a continuación enfriarla a 0 °C e interrumpir con cloruro de amonio acuoso saturado (500 ml). Añadir una disolución de bicarbonato sódico acuoso saturada (1 l) y permitir la separación de capas. Obtener la capa orgánica y concentrarla con tolueno (1 l) a agua residual azeótropa para producir el compuesto del título (168 g, 97 %) como un aceite naranja. <sup>1</sup>H RMN (300,13 MHz, DMSO): 8,66 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 8,55 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 8,06 (t, *J* = 2,2 Hz, 1H), 5,38 (s, 1H), 1,45 (s, 6H).

## 35 Preparación 4

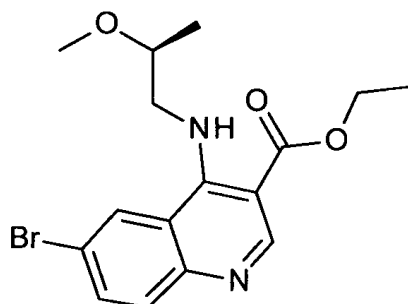
2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]propan-2-ol.



Purgar con una mezcla de 2-(5-bromo-3-piridil)propan-2-ol (18,5 g, 85,7 mmol), bis(pinacolato)diboro (44 g, 171  
 40 mmol, 2 eq.) y acetato potásico (25,2 g, 257 mmol, 3 eq.) en 1,4-dioxano (428 ml) en nitrógeno exhaustivamente. Añadir cloruro de (1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen)paladio(II) (3,5 g, 4,3 mmol) y evacuar y purgar la reacción dos veces con nitrógeno. Calentar la mezcla a 90 °C, durante toda la noche. Enfriar y diluir con acetato de etilo (1 l) y sonicar durante 30 minutos. Filtrar a través de una almohadilla de Celite® y secar el filtrado líquido sobre sulfato de sodio. Después de la filtración, concentrar el líquido orgánico y re-disolver el resto en acetato de etilo (1 l) y filtrar de nuevo a través de una almohadilla de Celite®. Concentrar el filtrado y suspender el resto en éter de dietilo (100 ml)  
 45 seguido de hexano (700 ml). Sonicar brevemente y filtrar para obtener un resto sólido para producir el compuesto titulado como un sólido bruto (18,5 g). EM (ESI) *m/z* (*M* + *H*)<sup>+</sup> 264,0.

## Preparación 5

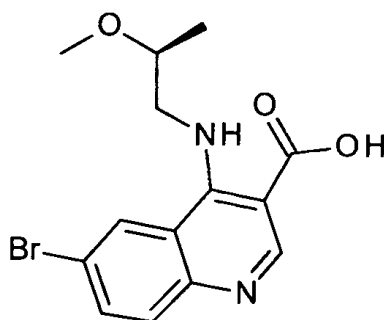
6-Bromo-4-[[[(2S)-2-metoxipropil]amino]quinolin-3-carboxilato de etilo



5 Suspender etil-6-bromo-4-cloro-quinolin-3-carboxilato (389 g, 1,24 mol) y clorhidrato de (2S)-2-metoxipropan-1-  
 amina (171 g, 1,36 mol, 1,1 eq.) en etanol (5,84 l). Añadir diisopropiletamina (474 ml) y calentar la mezcla a 50 °C  
 durante toda la noche. Después de 16 horas, enfriar la reacción a temperatura ambiente y concentrar al vacío.  
 Añadir éter de metil terc-butilo (2 l) al resto y agitar durante 20 minutos. Filtrar el precipitado y lavarlo con éter de  
 10 metil terc-butilo (2 x 250 ml). Concentrar el filtrado al vacío para producir el compuesto titulado en un rendimiento  
 casi cuantitativo. El compuesto se usará en la siguiente etapa sin purificación adicional. EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup>  
 367,0, 369,0.

## Preparación 6

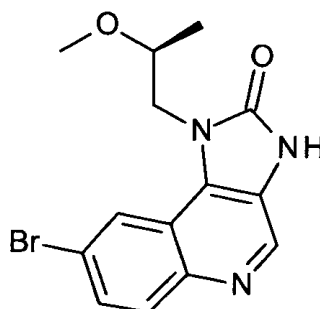
Ácido 6-bromo-4-[[[(2S)-2-metoxipropil]amino]quinolin-3-carboxílico



15 Añadir una disolución de hidróxido de sodio (296,7 g, 7,42 mol, 6 eq.) en agua (454 ml) a una disolución de 6-bromo-  
 4-[[[(2S)-2-metoxipropil]amino]quinolin-3-carboxilato de etilo (454 g, 1,24 mol) en tetrahidrofurano (4,54 l) a  
 temperatura ambiente. Calentar la mezcla a 50 °C durante toda la noche. Después de 18 horas, enfriar la reacción a  
 0° C, añadir HCl ac. al 37 % gota a gota durante 30 minutos hasta que el pH = 6 (aproximadamente 450 ml) con la  
 temperatura por debajo de 23 °C. Filtrar el precipitado formado con papel de filtro y lavarlo con agua (2 l), acetona (2  
 20 l) y éter de metil terc-butilo (2 l) posteriormente. Secar el sólido blanco para dar el compuesto titulado (359 g, 86 %).  
 EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 338,9, 340,9.

## Preparación 7

8-Bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona

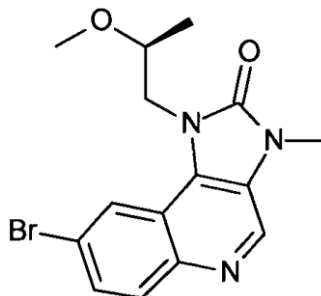


25 Suspender ácido 6-bromo-4-[[[(2S)-2-metoxipropil]amino]quinolin-3-carboxílico (510 g, 1,5 mol) en dimetilformamida  
 (7,65 l) y añadir trietilamina (419 ml, 3 mol, 2 eq.) a 70 °C. Añadir azida difenilfosfónica (390 ml, 1,8 mol, 1,2 eq.)  
 gota a gota durante 30 minutos. Calentar la mezcla a 70 °C (temperatura interna) durante 1 hora. Enfriar a 10 °C y

diluir con agua (5 l). Agitar la mezcla durante 1 hora, filtrar el precipitado, lavarlo con agua (2 x 1 l) y éter de metil terc-butilo (2 x 1 l), y a continuación dejarlo secar para dar el compuesto titulado como un sólido blanco (445 g, 88 %). EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 335,9, 337,9.

## Preparación 8

## 5 8-Bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



## Procedimiento 1

10 Suspendir 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (10 g, 30 mmol) y bromuro de tetra-N-butilamonio (3 g, 9,3 mmol) en diclorometano (150 ml). Añadir hidróxido de sodio acuoso 2 M (75 ml, 150 mmol) a temperatura ambiente. Añadir yodometano (7,5 ml, 120 mmol) y agitar la mezcla vigorosamente durante toda la noche a 28 °C. Permitir que tenga lugar la separación de fases. Concentrar los orgánicos al vacío. Lavar el resto con acetona (50 ml) para eliminar el bromuro de tetra-N-butilamonio. Filtrar la mezcla para dar el compuesto titulado como un polvo sólido (5 g, 48 %). EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 350,0, 352,0.

## Procedimiento 2

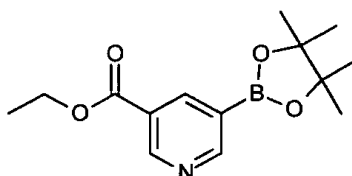
15 Suspendir 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (285 g, 847,7 mmol) y bromuro de tetra-N-butilamonio (82 g, 254 mmol) en diclorometano (2,85 l). Añadir hidróxido de sodio acuoso 2 M (1,7 l, 3,4 mol) a temperatura ambiente. Añadir sulfato de dimetilo (160,8 ml, 1,7 mol) y agitar la mezcla vigorosamente durante 3 horas. Permitir la separación de fases y obtener la capa orgánica. Concentrar la capa orgánica al vacío y suspender con agua (2,4 l) durante 30 minutos. Filtrar el precipitado sólido formado y lavarlo con agua (2 x 500 ml), hexano (2 x 500 ml) y secar. El compuesto titulado se obtiene como un sólido blanco (207 g, 70 %). EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 350,0, 352,0.

## Procedimiento 3

25 Suspendir 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (50 g, 149 mmol) y bromuro de tetra-N-butilamonio (14,4 g, 44,7 mmol) en diclorometano (500 ml). Añadir una disolución de hidróxido de sodio al 8 % (600 mmol). Añadir yodometano (23,2 g, 163,4 mmol) y agitar a temperatura ambiente durante 22 horas. Se separa la fase orgánica y se lava con agua (250 ml). A continuación la fase orgánica se concentra y se recristaliza a partir del diclorometano, a continuación se seca por debajo de 65 °C para dar el compuesto del título (42,7 g, 82 %). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8,70 (s, 1 H), 8,50 (d, 1 H, J = 2,4 Hz), 7,97 (d, 1 H, J = 9,2 Hz), 7,65 (d, 1 H, J = 9,2, 2 Hz), 4,32 (m, 2 H), 3,82 (m, 1 H), 3,79 (s, 3 H), 3,28 (s, 3 H), 1,32 (d, 3 H, J = 6,4 Hz).

## 30 Preparación 9

## 5-(4,4,5,5-Tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-carboxilato de etilo

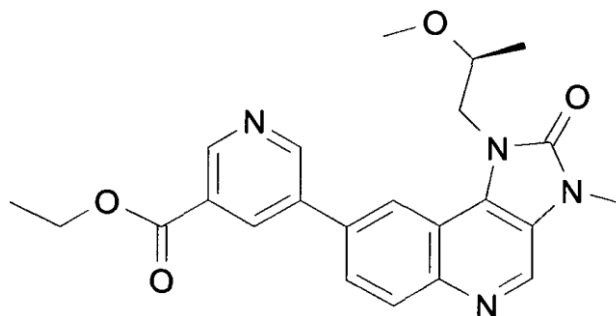


35 Añadir tris(dibencilidenacetona)dipaladio(0) (3,98 g, 4,35 mmol), triciclohexilfosfina (2,44 g, 8,7 mmol) y acetato potásico (42,65 g, 435 mmol) a una disolución de bis (pinacolato) diboro (35,88 g, 141,3 mmol) en dimetilformamida (175 ml). Burbujear N<sub>2</sub> en la mezcla durante 15 minutos, a continuación calentarla a 80–85 °C. A continuación añadir 5-bromonicotinato de etilo (25,0 g, 108,8 mmol) en dimetilformamida (75 ml) lentamente a la mezcla a 80–85 °C, y agitar la mezcla formada a 80–85 °C durante 4-5 horas. Enfriar la mezcla de reacción a 15-35 °C, y a continuación añadir éter de metil butil terciario (250 ml) y agua (250 ml). Filtrar la mezcla con diatomita y separar las capas orgánica y acuosa. Volver a extraer la capa acuosa con éter de metil butil terciario (250 ml). Lavar la capa orgánica combinada con salmuera (150 ml) y agua (150 ml). Concentrar la orgánica al vacío, re-cristalizar el producto bruto

con éter de metil butil terciario /heptano (1:6), y a continuación secarlo por debajo de 55 °C para dar el compuesto del título como un sólido gris (18,67 g, 62 %). <sup>1</sup>H RMN (acetona-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 1,40-1,43 (m, 15H), 4,44 (q, J=7,1Hz, 2H), 8,57(t, J=1,9Hz, 1H), 9,02(d, J=1,5Hz, 1H), 9,225(d, J=2,3Hz, 1H).

#### Preparación 10

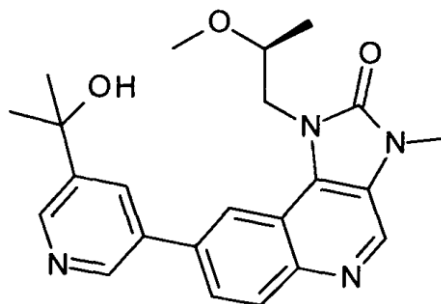
- 5 5-[1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-2-oxo-imidazo[4,5-c]quinolin-8-il]piridin-3-carboxilato de etilo



- 10 A un matraz de tres cuellos que contiene 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (35 g, 100 mmol), 5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-3-carboxilato de etilo (29,1 g, 105 mmol), acetato de etilo sódico (28,7 g, 350 mmol), 1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocen-paladio(II)dicloruro de diclorometano (0,817 g, 1,0 mmol) añadir 1,4-dioxano (200 ml) y agua (200 ml) en N<sub>2</sub>. A continuación calentar la mezcla de reacción a 85 °C y continuar agitando durante 10 horas. Enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente. Filtrar la mezcla con Sílice-Tiol Kieselguhr® para eliminar el catalizador. Añadir agua (400 ml) gota a gota y el sólido precipita. Filtrar la mezcla y lavar el sólido con agua (400 ml). Agitar el sólido en acetato de etilo (70 ml) a temperatura ambiente durante una hora; filtrar, lavar con acetato de etilo (70 ml) y secar al vacío por debajo de 65 °C para dar el compuesto del título (33,6 g, 80 %). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 9,25 (d, 1 H, J = 2 Hz), 9,15 (d, 1 H, J = 2,4 Hz), 8,75 (s, 1 H), 8,73 (d, 1 H, J = 1,6 Hz), 8,65 (t, 1 H), 8,24 (d, 1 H, J = 8,8 Hz), 7,89 (dt, 1 H, J = 8,8, 1,6 Hz), 4,47 (q, 2 H), 4,38 (m, 2 H), 3,90 (m, 1 H), 3,64 (s, 3 H), 3,26 (s, 3 H), 1,45 (t, 3 H), 1,37 (d, 3 H, J = 6 Hz).
- 15

#### Ejemplo 1

- 8-[5-(1-Hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



- 20 Procedimiento 1
- Disolver 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (0,600 g, 1,7 mmol) y 2-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil]propan-2-ol (0,9 g, 3,43 mmol) en tetrahidrofurano (75 ml) y agua (7,5 ml) en un tubo sellado. Purgar la mezcla con nitrógeno. Añadir fluoruro potásico (400 mg, 6,89 mmol), tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0) (200 mg, 0,22 mmol) y tetrafluoroborato de tri-terc-butilfosfonio (200 mg, 0,68 mmol). Sellar la reacción en nitrógeno y calentar a 65-70 °C durante toda la noche. Enfriar la mezcla a temperatura ambiente, filtrar para eliminar el resto inorgánico. Concentrar el filtrado y diluirlo con diclorometano (120 ml) y agua (30 ml). Separar la capa orgánica y secarla sobre polvo de sulfato de magnesio. Concentrarla al vacío a un aceite marrón. Purificar el resto por cromatografía en columna de gel de sílice con disolvente de elución de acetato de etilo al 30-65 % en hexano, a continuación con metanol al 0-7 % en diclorometano. Concentrar las fracciones que contienen el producto y co-evaporar con éter de dietilo (2 x 10 ml), acetona (10 ml), acetona y éter de dietilo (10 ml cada uno) posteriormente. Secar el resto sólido para producir el compuesto titulado como un polvo naranja (0,30 g, 44 %). EM (ESI) *m/z* (M + H)<sup>+</sup> 407,0.
- 25
- 30

#### Procedimiento 2

- 35 Purgar nitrógeno a través de una suspensión de 2-(5-bromo-3-piridil)propan-2-ol (100 g, 464 mmol, 1,25 eq.), 4,4,5,5-tetrametil-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (141,4 g, 557 mmol, 1,5 eq.) y



acetato potásico (127,5 g, 1,3 mol) en 1,4-dioxano (2,6 l) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añadir aducto de diclorometano de dicloro-((bis-difenilfosfino)ferrocenil)-paladio(II) (9 g, 11,14 mmol) en nitrógeno y calentar la mezcla a 90 °C. Agitar la mezcla durante 3 horas. Enfriar la mezcla de reacción a 80 °C y a continuación añadir 8-bromo-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (130 g, 371 mmol), una disolución de carbonato sódico (118 g, 1,1 mol) en agua (910 ml) y aducto de diclorometano de dicloro-((bis-difenilfosfino)ferrocenil)-paladio(II) (9 g, 11,14 mmol). Agitar la mezcla durante 1,5 horas a la misma temperatura. Permitir la separación de fases para obtener la capa orgánica y enfriarla a 40 °C antes de la concentración al vacío. Purificar el resto (350 g) por cromatografía en columna de gel de sílice con un disolvente de elución en gradiente de mezcla de diclorometano/acetato de etilo/metanol de 1:1:1 a 1:1:20. Obtener las fracciones que contienen el producto. Concentrar y suspender el resto en acetato de etilo (10 l/kg) a 40 °C durante 15 minutos, filtrar y lavar el sólido con acetato de etilo (2 x 1 l/kg) y éter de metil terc-butilo (2 x 2 l/kg). Disolver el sólido lavado en metanol (10 l/kg), tratar con Tiol SiliaBond® (0,4 g/g) para eliminar el metal residual. Agitar la suspensión a 23 °C durante 4 h y filtrar. Lavar el sólido con metanol (1 l/kg). Combinar todos los filtrados y los lavados de metanol y concentrar al vacío. Retener el sólido en el disolvente (aproximadamente 100 ml). El material cristaliza a partir del disolvente. Filtrar el material sólido y secar a 100 Pa/40 °C durante toda la noche para producir el compuesto titulado como un sólido blanco (77 g, 51 %). EM (ESI)  $m/z$  (M + H)<sup>+</sup> 407,1. <sup>1</sup>H RMN (500,23 MHz, DMSO): 9,05 (s, 1H), 8,95 (d, J= 2,2 Hz, 1H), 8,79 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 8,69 (d, J= 1,5 Hz, 1H), 8,33 (t, J= 2,1 Hz, 1H), 8,18 (d, J= 8,8 Hz, 1H), 8,12 (dd, J= 1,7, 8,8 Hz, 1H), 5,41 (s, 1H), 4,56 (dd, J= 8,3, 15,2 Hz, 1H), 4,37 (dd, J=4,2, 15,2 Hz, 1H), 3,85-3,80 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,12 (s, 3H), 1,56 (d, J= 1,2 Hz, 6H), 1,26 (d, J= 6,1 Hz, 3H).

## 20 Procedimiento 3

A una solución de 5-[1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-2-oxo-imidazo[4,5-c]quinolin-8-il]piridin-3-carboxilato de etilo (32,0 g, 76,1 mmol) en tetrahidrofurano (320 ml), añadir lentamente una disolución de MeMgBr (1,4 M en tetrahidrofurano/tolueno, 221,4 g, 6,92X) en protección de N<sub>2</sub> con una temperatura por debajo de 0 °C. Agitar la mezcla a -5~0 °C durante una hora en protección de N<sub>2</sub>. Añadir una disolución de NH<sub>4</sub>Cl (15 %, 320 ml) lentamente para interrumpir la reacción mientras que se mantiene la temperatura por debajo de 25 °C. A continuación añadir acetato de etilo (320 ml). Calentar la mezcla a 25~30 °C y agitar durante media hora. Después de la separación de dos capas, volver a extraer la capa acuosa con tetrahidrofurano (160 ml). Lavar el orgánico combinado con salmuera (192 ml). Añadir carbón activo (1,6 g) a la capa orgánica y agitar a 65~75 °C durante 4-5 horas. Filtrar la mezcla con Sílice-Tiol Kieselguhr® (1,6 g). Agitar la capa orgánica a 65~75 °C durante 2-3 horas; la mezcla se filtra a continuación por Sílice-Tiol Kieselguhr®. La capa orgánica se elimina al vacío y se re-cristaliza con acetato de etilo/tetrahidrofurano para dar 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona como un sólido amarillo claro (22,34 g, 72,2 %).

Añadir a un matraz de tres cuellos 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona preparado como anteriormente en este procedimiento 3 (50,0 g, 123 mmol) y tetrahidrofurano (1500 ml). Agitar la mezcla y calentarla a 45~55 °C para formar una disolución absoluta. Filtrar y concentrar el filtrado al vacío por debajo de 45 °C a 2,0-3,0 V y añadir acetato de etilo (500 ml), a continuación concentrar al vacío por debajo de 45 °C a 7~8 V. Agitar la suspensión a 70~80 °C durante 6-10 horas, a continuación enfriar a 20~25 °C y filtrar. Añadir acetato de etilo (135-140 g) y etanol (13,5-14,0 g) al resto. Agitar la suspensión a 70~ °C durante 6-10 horas; a continuación enfriar a 20~25 °C y filtrar. Concentrar al vacío para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (37,9 g, 75,8 %). <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8,86 (d, 1 H, J= 2 Hz), 8,76 (d, 1 H, J= 2,4 Hz), 8,71 (s, 1 H), 8,64 (d, 1 H, J= 1,6 Hz), 8,21 (t, 2 H), 7,85 (d, 1 H, J= 6,8 Hz), 4,36 (q, 2 H), 3,88 (m, 1 H), 3,62 (s, 3 H), 3,23 (s, 3 H), 2,79 (s, 1 H), 1,95 (s, 1 H), 1,71 (d, 6 H, J= 0,8 Hz), 1,33 (d, 3 H, J= 6,4 Hz).

## Ejemplo 2

8-[5-(1-Hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, Forma I

### Procedimiento 1

La base libre de impurezas (Ejemplo 1) se suspende en etilacetato, con un sólido blanco que empieza a precipitar desde una disolución parduzca. El sólido se filtra en una caja de manipulación con guantes dentro de la campana extractora y se permite que se seque al vacío dentro de la caja de manipulación con guantes durante toda la noche. El producto se deja al vacío durante toda la noche (11 g, 63,18 % de rendimiento).

Los patrones de difracción de Rayos-X (XRD) de polvo de los sólidos cristalinos se obtienen en un difractómetro de Rayos-X de polvo Bruker D4 Endeavor, equipado con una fuente de CuKα ( $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ ) y un detector Vantec, que funciona a 35 kV y 50 mA. La muestra se escanea entre 4 y 20° en 2θ, con un tamaño de etapa de 0,0087° en 2θ y una velocidad de escaneo de 0,5 segundos/etapa, y con divergencia de 0,6 mm, anti-difusor fijo de 5,28 mm y rendijas detectoras de 9,5 mm. El polvo seco se empaqueta en un soporte de muestra de cuarzo y se obtiene una superficie lisa usando un portaobjetos de vidrio. En la técnica de la cristalografía se sabe que, para cualquier cristal dado, formar las posiciones de pico angular puede variar ligeramente. Por ejemplo, las posiciones de los picos pueden desplazarse debido a una variación en la temperatura o la humedad a la que se analiza la muestra, un desplazamiento de la muestra o la presencia o ausencia de un patrón interno. En el presente caso, una variabilidad

de posición de pico de  $\pm 0,2$  en  $2\theta$  tendrá en cuenta estas variaciones posibles sin dificultar la identificación inequívoca de la forma cristalina indicada. La confirmación de una forma cristalina puede realizarse en base a una combinación exclusiva de picos diferentes (en unidades de  $^\circ 2\theta$ ), típicamente los picos más prominentes. Los patrones de difracción de las formas cristalinas, recogidos a temperatura ambiente y humedad relativa, se ajustan en base a picos patrón NIST 675 a 8,85 y 26,77 grados 2-theta.

De esta manera, una muestra preparada del compuesto se caracteriza por un patrón de XRD que usa radiación CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 siguiente. Específicamente el patrón contiene picos característicos que tienen lugar a 8,57 y uno o más de 9,06, 15,93, 18,29 y 18,87 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 1: Picos de difracción de rayos-X de polvo del Ejemplo 2, procedimiento 1

Pico	Ángulo ( $^\circ$ 2-Theta)	Intensidad (%)
1	8,57	100,00
2	9,06	35,40
3	9,44	13,30
4	10,22	10,60
5	11,90	13,10
6	13,57	20,10
7	14,07	15,60
8	15,93	32,50
9	18,29	73,40
10	18,87	74,50
11	20,40	16,70
12	21,57	16,10
13	23,19	30,70
14	25,54	21,90
15	27,47	19,80
16	32,17	9,60

#### Procedimiento 2

Disolver una cantidad razonable de la base libre del Ejemplo 1 en etanol o tetrahidrofurano para fabricar una disolución. Evaporar la disolución para proporcionar el compuesto del título.

De esta manera, una muestra preparada del compuesto del título se caracteriza por un patrón de XRD que usa radiación CuKa como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 1 siguiente. Específicamente el patrón contiene picos característicos que tienen lugar en 8,60 junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 9,08, 15,93, 18,25 y 18,83 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 2: Picos de difracción de rayos-X de polvo del Ejemplo 2, procedimiento 2

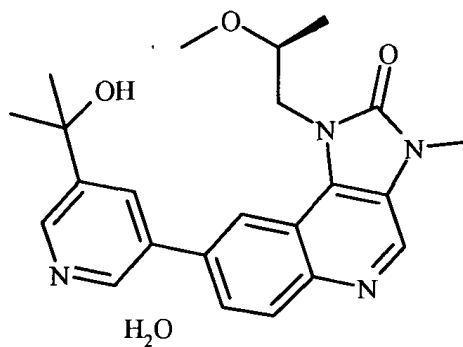
Pico	Ángulo ( $^\circ$ 2-Theta)	Intensidad (%)
1	8,60	70,1
2	9,08	36,5
3	9,46	15,3
4	10,23	17,9
5	11,91	17,2

(continuación)

Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
6	13,15	11,5
7	13,57	13,7
8	14,08	23,0
9	15,93	47,1
10	18,25	80,4
11	18,83	100,0
12	20,61	22,9
13	21,54	22,3
14	23,16	13,1
15	25,52	39,6
16	26,13	39,6
17	27,43	16,9
18	28,55	14,2
19	29,48	17,4
20	32,13	12,1

**Ejemplo 3**

5 Monohidrato de 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



10 El ejemplo 3 puede prepararse suspendiendo una mezcla de una forma de metanolato de la base libre (el metanolato es una forma cristalina obtenida a partir de una disolución de metanol de la base libre), junto con una forma anhídrida de la base libre (véase el Ejemplo 2) en una cantidad razonable de agua durante 24 horas. Alternativamente, suspender la forma anhídrida de la base libre (véase el Ejemplo 2) en una disolución de acetona/agua (relación 95:5,  $a_w = 0,57$ ) y sembrar con la forma monohidrato dará como resultado una conversión completa de la forma I anhídrida en el monohidrato deseado en 24 horas.

Las condiciones para obtener la difracción de Rayos-X (XRD) de polvo del Ejemplo 3 son esencialmente las mismas que las condiciones descritas en el Ejemplo 2.

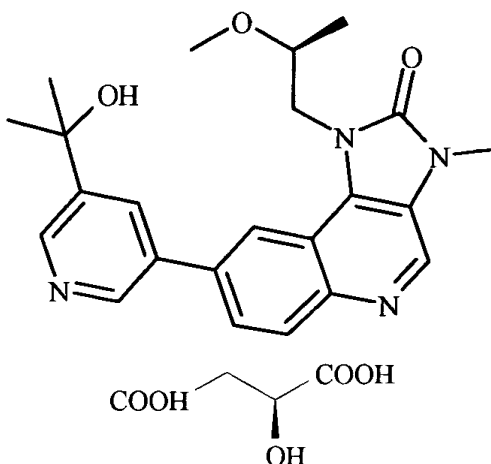
15 De esta manera, una muestra preparada del compuesto del título se caracteriza por un patrón de XRD que usa radiación CuK $\alpha$  como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 3 a continuación. Específicamente el patrón contiene un pico en 13,57 junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 6,75, 9,71, 16,35, 16,98 y 19,54 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 3: Picos de difracción de rayos-X de polvo del Ejemplo 3

Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
1	6,75	14,2
2	9,71	18,3
3	11,35	12,5
4	13,57	100,0
5	16,35	15,6
6	16,98	48,8
7	19,54	11,5
8	20,40	13,0

**Ejemplo 4**

5 Malato de 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



10 El Ejemplo 4 puede prepararse suspendiendo una base libre (53,5 mg) en acetona (2 ml) y a continuación incorporando ácido L-málico (22 mg). Los sólidos se disuelven en una disolución clara. Los sólidos cristalinos blancos precipitan a partir de la disolución. Un filtro de vacío y el aire secan los sólidos. Secar la sal de malato en un horno de vacío (65 °C) durante toda la noche para proporcionar el compuesto del título.

Las condiciones para obtener la difracción de Rayos-X (XRD) de polvo del Ejemplo 4 son esencialmente las mismas que las condiciones descritas en el Ejemplo 2.

15 De esta manera, una muestra preparada del compuesto del título se caracteriza por un patrón de XRD que usa radiación CuK $\alpha$  como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 4 a continuación. Específicamente el patrón contiene un pico en 5,39 junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 10,33, 12,16, 15,57 y 20,08 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 4: Picos de difracción de rayos-X de polvo del Ejemplo 4

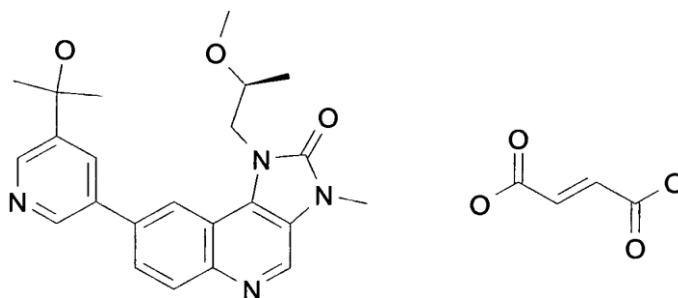
Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
1	5,39	100,00
2	10,33	38,8
3	11,81	12,1
4	12,16	40,4
5	13,20	17,5

(continuación)

Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
6	15,57	30,7
7	16,22	16,3
8	16,47	20,7
9	19,26	26,6
10	20,08	55,9
11	20,46	42,9
12	21,86	26,3
13	22,51	24,7
14	24,08	46,5
15	24,68	12,3
16	25,59	35,0
17	28,11	26,4

**Ejemplo 5**

5 Fumarato de 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona



10 El Ejemplo 5 puede prepararse añadiendo base libre 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona (60,2 mg) a 1-butanol (0,5 ml) y a continuación añadir 21,9 mg de ácido fumárico. Añadir heptano (5 x 0,5 ml), que produce una suspensión blanca espesa, y agitar a 90 °C/500 rpm. Filtrar al vacío y secar en nitrógeno. Los sólidos se pierden durante la recuperación de la filtración, aunque es suficiente para la XRD. Se prepara sal de fumarato cristalina adicional añadiendo base libre (101,0 mg) a 1-butanol (0,5 ml) y a continuación añadir 34 mg de ácido fumárico. Añadir heptano (6 x 0,5 ml) y semillas cristalinas de la sal de fumarato de la primera preparación y agitar la mezcla a 90 °C/500 rpm durante 1 hora. Recuperar los sólidos por filtración al vacío y secar los sólidos en nitrógeno. Secar adicionalmente los sólidos en un horno de vacío (65 °C) durante toda la noche para proporcionar el compuesto del título.

Las condiciones para obtener la difracción de Rayos-X (XRD) de polvo del Ejemplo 5 son esencialmente las mismas que las condiciones descritas en el Ejemplo 2.

20 De esta manera, una muestra preparada del compuesto del título se caracteriza por un patrón de XRD que usa radiación CuK $\alpha$  como que tiene picos de difracción (valores 2-theta) como se describe en la Tabla 5, dada a continuación. Específicamente el patrón contiene un pico en 5,10 junto con uno o más de los picos seleccionados del grupo que consiste en 8,55, 15,45, 15,78 y 22,50 con una tolerancia para los ángulos de difracción de 0,2 grados.

Tabla 5: Picos de difracción de rayos-X de polvo del Ejemplo 5

Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
1	5,10	100,00
2	8,55	17,1

(continuación)

Pico	Ángulo (° 2-Theta)	Intensidad (%)
3	12,14	6,0
4	15,45	26,7
5	15,78	11,0
6	18,50	5,9
7	19,94	7,4
8	20,88	5,1
9	21,55	4,5
10	22,50	14,5
11	24,92	7,9
12	26,41	5,9

**Ensayo enzimático *in vitro* de mTOR (FRAP1)**

5 Usar el Ensayo de Quinasa mTOR LanthaScreen™ (Invitrogen) para determinar los valores  $CI_{50}$  del compuesto frente a la mTOR quinasa. Se trata de un formato de ensayo de Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia Resuelta en Tiempo (TR-FRET) que usa un anticuerpo marcado con terbio de larga vida útil como especie donadoras y 4E-BP1 marcada con Proteína Fluorescente Verde (GFP) como especiesceptoras. Usar la relación TR-FRET para monitorizar la actividad mTOR cuando un aumento en la fosforilación de la proteína da como resultado un aumento en la relación TR-FRET. Realizar la reacción de la quinasa usando un volumen de reacción de 12,5 microlitros en una Proxiplaca de 384 pocillos poco profundos negros. Añadir reactivos para obtener las condiciones de reacción finales de ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 50 milimolar a pH 7,5, ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -amino etiléter) - N, N, N', N' - tetraacético (EGTA) 1 milimolar, Tween 20 al 0,01 %, cloruro de manganeso 10 mM, DL-ditiotreitol (DTT) 2 mM, GFP-4E-BP1 (un sustrato fisiológico del mTOR, 4E-BP1 expresada y purificada como una fusión con la proteína fluorescente verde, Invitrogen) 0,4 micromolar, mTOR (mTOR humano recombinante, restos 1360 - 2549, etiquetado con glutatión-S-transferasa (GST), expresado en células de insecto, Invitrogen) 70 ng por mililitro, dimetil sulfóxido al 4 % y diluciones seriadas del compuesto (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nM). Añadir enzima y sustrato al compuesto y a continuación añadir adenosín trifosfato (ATP) a 10  $\mu$ M para empezar la reacción. Incubar a temperatura ambiente durante 60 min y a continuación añadir 12,5  $\mu$ l de tampón de dilución de anticuerpos que contiene anticuerpo anti-fosfo-treonina46 4E-BP1 marcado con terbio 4 nM y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, clorhidrato de tris(hidroximetil)aminoetano (Trizma®) 0,67 mM a pH 7,5, azida sódica al 0,02 % y nonilfenilpolietilenglicol (Nonidet® P40) al 0,01 %. Incubar a TA durante 60 min, y leer en un lector de placas EnVision con un filtro de excitación de longitud de onda de 340 nm y filtros de emisión de longitudes de onda de 495 nm y 520 nm. Usar la señal medida con un filtro de 520 nm (específico para GFP) sobre la señal medida con un filtro de 495 (específico para terbio) para calcular la relación TR-FRET. Derivar el valor  $CI_{50}$  para cada compuesto usando los datos del porcentaje de inhibición que se calculan a partir de los datos de reacción respectivos a los controles en placa (relación TR-FRET de puntos de datos de ensayo respectivos a controles en placa sin ATP). Usar ACTIVITYBASE 4.0 para ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de compuesto a diez puntos para una ecuación logística de cuatro parámetros.

30 En este proceso de ensayo se analiza un compuesto dentro del ámbito de la presente invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor absoluto  $CI_{50}$  de 0,165  $\mu$ M ( $\pm 0,0925$ , n=5). Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son fuertes inhibidores de mTOR.

**Ensayo enzimático *in vitro* de fosfoinositida 3-quinasa alfa (PI3Ka)**

35 Usar el ensayo de Proximidad de Centelleo de PI3Ka para determinar los valores  $CI_{50}$  de los compuestos frente a PI3Ka quinasa. Este ensayo evalúa la actividad PI3Ka en presencia de inhibidores del compuesto midiendo la incorporación de  $\gamma$ - $P^{33}$ -ATP en fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Realizar las reacciones quinasa en volúmenes de reacción de 40  $\mu$ l en placas de poliestireno de fondo transparente de 96 pocillos de media área de fondo plano blanco. Añadir PI3Ka para iniciar la reacción. Las condiciones finales de reacción son 2,2-bis(hidroximetil)-2,2',2''-nitrilotrietanol (Bis-Tris) 43,75 mM a pH 7,0, cloruro sódico (NaCl) 306 mM, éter de polietilenglicol octilfenilo (Triton™ X-100) 1,76 mM, adenosín trifosfato (ATP) 10  $\mu$ M, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 2,9 mM y  $\gamma$ - $P^{33}$ - adenosín trifosfato ( $\gamma$ - $P^{33}$ -ATP) 1  $\mu$ Ci por pocillo, enzima recombinante humana PI3Ka 5,0 nM, palmitoil-oleoil fosfatidilserina (POPS) 0,2 mM, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) 0,04 mM, DMSO al 4 % y diluciones seriadas de compuesto (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nM). Incubar a TA durante 90 min después de añadir PI3Ka. Detener la reacción con la adición de

40  $\mu\text{l}$  de un tampón de detención que contiene 2,5 mg/ml de perlas unidas a neomicina (Amersham, N° Cat RPNQ0506) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 21 mM. Centrifugar las placas durante 30 minutos a 1000 revoluciones por minuto (RPM) y contar la radiactividad con un Wallac Microbeta Trilux normalizado para P<sup>33</sup>. Derivar el valor  $\text{Cl}_{50}$  para el Ejemplo 1 usando los datos de porcentaje de inhibición calculados usando los datos de  
 5 reacción con respecto a los controles en placa (enzima activa frente a controles de enzima inhibida por EDTA 62,5 milimolar). Ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de compuesto a diez puntos para una ecuación logística de cuatro parámetros usando ACTIVITYBASE 4.0.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor absoluto  $\text{Cl}_{50}$   
 10 de 0,00607  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,00338$ ,  $n=2$ ). Estos resultados muestran que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son fuertes inhibidores de PI3Ka.

#### Ensayo enzimático *in vitro* de fosfoinositida 3-quinasa beta (PI3Kb)

Usar el ensayo de Proximidad de Centelleo de PI3K beta (SPA PI3K beta) para determinar los valores  $\text{Cl}_{50}$  frente a  
 15 PI3Kb para un compuesto. Este ensayo evalúa la actividad PI3K beta en presencia de inhibidores del compuesto midiendo la incorporación de  $\gamma$ -P33-ATP en fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP<sub>2</sub>). Realizar las reacciones de la quinasa en volúmenes de reacción de 40  $\mu\text{l}$  en placas de poliestireno con fondo transparente de 96 pocillos de media área de fondo plano blanco. Añadir PI3K beta para iniciar la reacción. Las condiciones finales de reacción son 2,2-bis(hidroxiometil)-2,2',2''-nitrotrietanol (Bis-Tris) 43,75 mM a pH 7,0, cloruro sódico (NaCl) 87,5 mM, éter de polietilenglicol octilfenilo (Triton™ X-100) 1,76 mM, adenosín trifosfato (ATP) 40  $\mu\text{M}$ , cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) 1,0  
 20 mM y  $\gamma$ -P<sup>33</sup>- adenosín trifosfato ( $\gamma$ -P33-ATP) 1  $\mu\text{Ci}$  por pocillo, enzima recombinante humana PI3K beta 6,0 nM, palmitoil-oleoil fosfatidilserina (POPS) 0,2 mM, fosfatidilinositol (4,5) bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) 0,04 mM, DMSO al 4 % y diluciones seriadas de compuesto (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nM). Incubar a TA durante 90 min después de añadir PI3K beta. Parar la reacción con la adición de 40  $\mu\text{l}$  de un tampón para parar que contiene 2,5 mg/ml de perlas unidas a neomicina (Amersham, N° Cat RPNQ0506) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 21 mM. Centrifugar  
 25 las placas durante 30 minutos a 1000 revoluciones por minuto (RPM) y contar la radiactividad con un Wallac Microbeta Trilux normalizado para P33. Derivar el valor  $\text{Cl}_{50}$  para el compuesto usando los datos de porcentaje de inhibición calculados usando los datos de reacción con respecto a los controles en placa (enzima activa frente a controles de enzima inhibida por EDTA 62,5 milimolar). Ajustar el porcentaje de inhibición y los datos de concentración de compuesto a diez puntos para una ecuación logística de cuatro parámetros usando  
 30 ACTIVITYBASE 4.0.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor absoluto  $\text{Cl}_{50}$   
 de 0,0776  $\mu\text{M}$  ( $\pm 0,0401$ ,  $n=2$ ). Estos resultados muestran que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son fuertes inhibidores de PI3Kb.

#### 35 Ensayos enzimáticos *in vitro* de Fosfoinositida 3-quinasa delta (PI3Kd) y Fosfoinositida 3-quinasa gamma (PI3Kg)

Usar el ensayo de quinasa Adapta® para la detección del ADP por inmunoensayo basado en fluorescencia. Se trata de un formato de ensayo FRET Resuelta en Tiempo (TR-FRET) que usa un anticuerpo anti-ADP marcado con Europio y un indicador de ADP marcado con un Alexa Fluor® 647 (AF647) para monitorizar la producción de ADP por  
 40 la quinasa. Usar la relación TR-FRET para monitorizar la actividad PI3K delta o PI3K gamma donde un aumento en la fosforilación de lípidos y la producción de ADP aumentada correspondiente da como resultado una disminución en la TR-FRET.

Reacciones enzimáticas: Realizar la reacción de la quinasa para PI3Kd usando un volumen de reacción de 10 microlitros en una placa de 384 pocillos blancos de poco volumen Corning® (Corning® N°3674). Añadir reactivos para obtener las condiciones finales de reacción de 0,47-2,6 nanogramos de PI3K delta (PI3Kd humana de longitud completa recombinante expresada en y purificada de células de insecto, Invitrogen) y PIP<sub>2</sub> 50 micromolar: PS en HEPES 32,5 milimolar, a pH 7,5, cloruro sódico 50 milimolar, CHAPS al 0,015 %, cloruro de magnesio 1,5 milimolar, EGTA 0,5 milimolar, ATP 25 micromolar, DMSO al 1 % y compuesto diluido seriado (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nanomolar). Añadir el ATP al compuesto y a continuación añadir la mezcla sustrato/quinasa para iniciar la reacción.  
 45 Agitar la placa durante 30 segundos y a continuación incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Realizar la reacción de la quinasa PI3Kg usando un volumen de reacción de 10 microlitros en una placa de 384 pocillos blancos de poco volumen Corning® (Corning® N° 3674). Añadir reactivos para obtener las condiciones finales de reacción de 3,5-26 nanogramos de PI3K gamma (PI3Kg humana de longitud completa recombinante expresada en y purificada de células de insecto, Invitrogen) y PIP<sub>2</sub> 50 micromolar: PS en HEPES 32,5 milimolar, a pH 7,5, EGTA 0,5  
 50 milimolar, cloruro de magnesio 1,5 milimolar, ATP 25 micromolar, DMSO al 1 % y compuesto diluido seriado (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nanomolar). Añadir el ATP al compuesto y a continuación añadir la mezcla sustrato/quinasa para iniciar la reacción. Agitar la placa durante 30 segundos, centrifugar 2 minutos a 1000 x g y a continuación incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos.

5 DetECCIÓN DE ADP: Añadir 5 microlitros de Mezcla de Detección (EDTA 30 mM, anticuerpo anti ADP marcado con Eu 30 nM y la concentración EC60 del indicador de ADP para las reacciones con ATP 5-100  $\mu$ M, Invitrogen) a las reacciones enzimáticas de PI3K delta y gamma. Agitar la placa durante 30 segundos, centrifugar 2 minutos a 1000 x g y a continuación incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Leer las placas en un lector de placas fluorescente usando un filtro de excitación de longitud de onda de 340 nm y filtros de emisión de longitudes de onda de 665 nm y 615 nm. Usar la señal medida con un filtro de 665 nm (específico para la emisión AF647 poli GT) sobre la señal medida con el filtro de 615 (específico para europio) para calcular la relación TR-FRET. Usar la relación TR-FRET para calcular la concentración de ADP volviendo a calcular una curva patrón ATP/ADP que está ajustada a un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis número 205 (XLfit de IDBS). Derivar el valor  $CI_{50}$  para cada compuesto usando los datos de porcentaje de inhibición que se calculan a partir de los datos de reacción con respecto a los controles en placa (concentración de ADP de los puntos de datos del ensayo con respecto a controles en placa sin ATP). Usar XLfit (IDBS) para ajustar el porcentaje de inhibición y datos de concentración de compuesto de diez puntos para un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis 205 (XLfit de IDBS).

15 En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor absoluto  $CI_{50}$  de 0,0380  $\mu$ M para PI3Kd y un valor absoluto  $CI_{50}$  de 0,0238  $\mu$ M para PI3Kg. Estos resultados muestran que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son fuertes inhibidores de PI3Kd y PI3Kg.

#### Ensayo enzimático *in vitro* de Proteína Quinasa Dependiente de ADN (ADN-PK)

20 Usar el formato de ensayo de quinasa Z'LYTE<sup>®</sup> (Invitrogen) para determinar los valores  $CI_{50}$  frente a ADN-PK para un compuesto. Se trata de un formato de ensayo enzimático acoplado, basado en fluorescencia, basado en la sensibilidad del sustrato peptídico marcado de forma dual fosforilado frente a no fosforilado (Cumarina en el extremo amino, Fluoresceína en el extremo carboxilo) a la proteólisis. Usar la relación de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET) para monitorizar la actividad ADN-PK donde la fosforilación del péptido protege al péptido de la escisión proteolítica y la FRET del sustrato se mantiene. Realizar la reacción de la quinasa usando un volumen de reacción de 10 microlitros en una placa de 384 pocillos negros de poco volumen NBS Corning<sup>®</sup> (Corning<sup>®</sup>N<sup>o</sup>3676). Añadir reactivos para obtener las condiciones finales de reacción de ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico (HEPES) 50 milimolar a pH 7,5, tensoactivo no iónico BRIJ-35 al 0,01 %, cloruro de magnesio 10 milimolar, ácido etilenglicol-bis ( $\beta$ -amino etiléter) - N, N, N' N' - tetraacético (EGTA) 1 milimolar, DL-ditiotreitol (DTT) 1 mM, 2,5 microgramos/mililitro de ADN de Timo de Ternera (CT ADN), 3,88-27,3 nanogramos de ADN-PK, 2 micromolar del péptido marcado Ser/Thr 26 (Invitrogen), dimetil sulfóxido al 1 % y diluciones seriadas del compuesto (diluido 1:3 de 20.000 a 1 nanomolar). Añadir enzima y sustrato al compuesto a continuación añadir adenosín trifosfato (ATP) 25,0 micromolar para iniciar la reacción. Agitar la placa durante 30 segundos a continuación incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Añadir 5 microlitros de una dilución 1:16 de Disolución de Reactivo de Desarrollo B (Invitrogen), agitar la placa durante 30 segundos y a continuación incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos. Leer la placa en un lector de placas fluorescente con un filtro de excitación de longitud de onda de 400 nm y filtros de emisión de 445 y 520 nm. Usar la señal medida con un filtro de 445 nm (específico para Cumarina) sobre la señal medida con el filtro de 520 (específico para fluoresceína) para calcular la relación FRET. Derivar el valor  $CI_{50}$  para cada compuesto usando los datos del porcentaje de inhibición calculados a partir de los datos de reacción con respecto a los controles en placa (control de DMSO para el 0 % de inhibición y no reacción de ATP para el 100 % de inhibición). Usar XLfit (IDBS) para ajustar el porcentaje de inhibición y datos de concentración de compuesto de diez puntos para un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis (número de modelo 205).

45 En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor absoluto  $CI_{50}$  de 0,00424  $\mu$ M. Estos resultados muestran que los compuestos dentro del alcance de la presente invención son fuertes inhibidores de ADN-PK.

#### Detección por AlfaScreen SureFire de Quinasa p70S6 fosforilada (Thr389), AKT (Thr308) y AKT (Ser473) en Células U87MG

50 Usar el AlphaScreen SureFire<sup>®</sup> para p-p70S6 quinasa (Thr389) (TGR Biosciences, TGRAS50K), p-AKT (Thr308) (TGR Biosciences, TGRA2S50K) y p-AKT (Ser473) (TGR Biosciences, TGRAS50K) para determinar el efecto del Ejemplo 1 en la formación de quinasa p70S6 (Thr389), AKT (Thr308) y AKT (Ser473) fosforiladas endógenas respectivamente. Este formato de ensayo homogéneo usa captura por inmuno-sándwich del analito fosforilado y después la detección con perlas Alphascreen cubiertas con anticuerpos para generar una señal amplificada.

55 Mantener unas células U87MG en medio de crecimiento U87MG que consiste en DMEM (GIBCO 11965-092) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS, GIBCO, 10091-141), un 1 % de aminoácidos no esenciales (GIBCO, 11140-050) y un 1 % de piruvato sódico (GIBCO, 11360-070). Recuperar las células usando procedimientos de cultivo celular convencionales y a continuación contar usando Vi-Cell. Sembrar en placa 100  $\mu$ l de células U87MG en medio de crecimiento (50.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos Costar N<sup>o</sup>3596 e incubar durante toda la noche a 37 °C, al 5 % de CO<sub>2</sub>.



El día del ensayo, tratar las células con Ejemplo 1 (20 µl/pocillo) diluido en medios que contienen DMSO al 6 %. Incubar durante una h a 37 °C, a continuación eliminar el medio y añadir 50 µl de Tampón de Lisis 1x SureFire (componente del Kit TGR Biosciences *SureFire*®) a cada pocillo e incubar a temperatura ambiente durante 10 min con agitación suave. Transferir 6 µl de lisado y 10 µl de mezcla de reacción (60 partes de tampón de reacción/10 partes de tampón de activación/1 parte de cada perla donante y aceptora, Perkin Elmer, 6760617R) a una proxiplaca de 384 pocillos (Perkin Elmer, 6006280) para los ensayos de quinasa p-p70S6 (Thr389) y p-AKT(Ser473). Sellar la placa e incubar a TA durante 4 h. Transferir 4 µl de lisado y 5 µl de mezcla de reacción (40 partes de tampón de reacción/10 partes de tampón de activación/1 parte de perla aceptora) a una proxiplaca de 384 pocillos para el ensayo de p-AKT(Thr308). Incubar durante 2 h a TA y a continuación añadir 2 µl de mezcla de dilución (20 partes de tampón de dilución/1 parte de perla donante) a cada pocillo. Sellar la placa e incubar a TA durante otras 2 h. Leer las placas en un Perkin Elmer EnVision equipado con un TurboMódulo que usa ajustes AlphaScreen® convencionales (EX<sub>680nm</sub> y Em<sub>520-620nm</sub>). Calcular los datos del porcentaje de inhibición a partir de los datos de reacción con respecto al control en placa. A continuación usar ACTIVITYBASE 4.0 para ajustar el porcentaje de inhibición a partir de los datos de concentración de compuesto de diez puntos para una ecuación logística de cuatro parámetros para derivar el valor CI<sub>50</sub> para el Ejemplo 1.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene valores absolutos CI<sub>50</sub> como se proporcionan en la Tabla 6. Estos resultados muestran que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención inhiben enzimas en las rutas de PI3K y mTOR en las células U87MG.

Tabla 6

	AKT1(pT308)	AKT1(pS473)	P70S6(pT389)	S6RP(pS240/242)
Ejemplo	CI <sub>50</sub> Absoluto (µM)	CI <sub>50</sub> Absoluto (µM)	CI <sub>50</sub> Absoluto (µM)	CI <sub>50</sub> Absoluto (µM)
1	0,106 (±0,0649, n=4)	0,0942 (±0,0421, n=4)	0,0106 (±0,00296, n=4)	0,0191 (±0,00204, n=3)

### Ensayo de Proliferación Celular

Usar el Sistema de ensayo de Viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo (disponible en el comercio de Promega) para medir la actividad antiproliferativa del Ejemplo 1 determinando el número de células viables en cultivo en base a la cuantificación del ATP presente, que señala la presencia de células metabólicamente activas.

Sembrar en placas células en una placa de 96 pocillos a 2000 células/pocillo en 100 µl de medio específico celular (para U87MG usar DMEM, FBS al 10 %, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico (HEPES) 25 mM, piruvato sódico 1,0 mM y Aminoácidos No Esenciales 0,1 mM (ATCC N° Cat. 30-2002); para HT1080 usar MEM de Eagle, FBS al 10 % (ATCC N° Cat. 30-2003); para H1975, A2780, SJSA-1 y 786-O usar RPMI 1640, FBS al 10 % (ATCC N° Cat. 30-2001); para A204 usar 5A de McCoy, FBS al 10 % (ATCC N° Cat. 30-2007) excepto en la columna 1 usar solamente medio como el control blanco). Incubar las placas durante toda la noche a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. El siguiente día, preparar disoluciones madre del compuesto a 1 mM en DMSO y diluir en serie en DMSO en una placa de polipropileno de fondo redondo de 96 pocillos. Ensayar los compuestos a 10 concentraciones por duplicado, 4 compuestos por placa.

Transferir 4 µl de las disoluciones seriadas en DMSO a una placa de 96 pocillos y añadir 196 µl de medio de cultivo para crear una disolución madre 10 X para dosificar. Transferir suavemente 11 µl de cada disolución madre de dosificación al pocillo correspondiente de la placa de células dando como resultado una concentración de DMSO del 0,2 % y un volumen final de 111 µl. Añadir 11 µl de medio a las columnas control (Columna 12) y a las columnas de fondo (Columna 1). Incubar las células con el compuesto a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 o 96 h (Para H1975, 786-O, HT1080, A2780, A204 y SJSA-1 usar 72 h y para U87MG usar 96 h).

Preparar el reactivo CellTiter-Glo (Promega, Cat: G7571) y añadir 100 l a cada pocillo después de que la incubación esté completada, homogeneizar las células mezclando en un agitador orbital durante 2 min y a continuación incubar a TA durante 10 min para permitir que la señal luminiscente se estabilice. Registrar los datos de luminiscencia sin procesar con un lector de placas Wallac Victor V. Calcular los valores CI<sub>50</sub> para el Ejemplo 1 usando los datos del porcentaje de inhibición. Se ajusta una curva logística de cuatro parámetros para cada respuesta de dosis.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene valores CI<sub>50</sub> absolutos como se proporcionan en la Tabla 7. Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son útiles inhibiendo la proliferación de las líneas celulares U87MG, H1975, 786-O, A2780, HT-1080, A204 y SJSA-1.

Tabla 7

CI <sub>50</sub> U87MG (μM)	CI <sub>50</sub> H1975 (μM)	CI <sub>50</sub> 786-O (μM)	CI <sub>50</sub> A2780 (μM)	CI <sub>50</sub> HT-1080 (μM)	CI <sub>50</sub> A204 (μM)	CI <sub>50</sub> SJSA-1 (μM)
0,074	0,102	0,126	0,090	0,072	0,097	0,096

### Ensayo Clonogénico de Tumores Oncotest

5 Usar la colección Oncotest (GmbH de Freiburg, Alemania) de xenoinjertos de tumores humanos desarrollados subcutáneamente en ratones desnudos inmunodeficientes para medir la respuesta al Ejemplo 1 a una diversidad de tipos de tumores. Los xenoinjertos, trasplantados directamente de pacientes a, y en pasas en, ratones desnudos, conservan la mayoría de las características de los tumores del paciente donante a los fármacos convencionales contra el cáncer a un alto grado. Preparar células tumorales directamente a partir de xenoinjertos de tumores humanos que crecen en ratones desnudos. Medir la inhibición de la formación de colonias independientes ancladas de las células tumorales en agar blando.

15 El Ejemplo de Ensayo 1 en los modelos de xenoinjertos de tumores humanos derivados de pacientes se muestra en la Tabla 10, que comprende de 2 a 10 modelos de 13 histotipos de tumores humanos diferentes, denominados cáncer de vejiga, de colon, gástrico, de cabeza y cuello, pulmonar no microcítico (células adenoescamosas y células grandes), de mama, de ovarios, de páncreas, de próstata y cáncer renal, así como melanoma, mesotelioma pleural y sarcoma, donde md es moderadamente diferenciado, pd es pobremente diferenciado, id es indiferenciado y bd es bien diferenciado.

#### Preparación de Suspensiones Unicelulares de Xenoinjertos de Tumores Humanos

20 Hacer crecer xenoinjertos de tumores humanos sólidos subcutáneamente con pasas en serie en ratones desnudos con timo aplásico (cepa NMRI nu/nu) y extirpar los tumores en condiciones estériles, disgregar mecánicamente y posteriormente incubar con un cóctel enzimático que consiste en colagenasa de tipo IV (41 U/ml), ADNasa I (125 U/ml), hialuronidasa (100 U/ml) y dispasa II (1,0 U/ml) en medio RPMI 1640 a 37 °C durante 45 minutos. Pasar las células a través de tamices de 200 μm y 50 μm de tamaño de malla y lavar dos veces con tampón PBS estéril. Determinar el porcentaje de células viables en un hemocitómetro Neubauer usando exclusión con azul tripano.

#### Procedimiento de Ensayo Clonogénico con Células de Xenoinjertos de Tumores Humanos

30 Realizar el ensayo clonogénico en un formato de 24 pocillos de acuerdo con un ensayo de agar blando de dos capas modificado (Hamburger et al., Science 197:461-643, 1997). La capa del fondo consiste en 0,2 ml/ pocillo de IMDM (complementado con suero de ternera fetal al 20 % (v/v), gentamicina al 0,01 % (p/v) y agar al 0,75 % (p/v). Añadir de 0,8·10<sup>4</sup> a 5·10<sup>4</sup> células a 0,2 ml del mismo medio de cultivo complementado con agar al 0,4 % (p/v) y sembrar en placa en la capa del fondo en placas de 24 pocillos. Aplicar el compuesto de ensayo por exposición continua (superposición de fármaco) en 0,2 ml de medio de cultivo. Añadir la superposición de fármaco 24 horas después de sembrar las células como una disolución concentrada tres veces. Incluir seis pocillos control sin tratar y 6 concentraciones de grupos tratados con fármacos por triplicado en cada placa. Incubar los cultivos a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 7,5 % en una atmósfera humidificada durante hasta 20 días y monitorizar cercanamente para el crecimiento de colonias usando un microscopio invertido. Dentro de este período, el crecimiento de tumores *in vitro* da lugar a la formación de colonias con un diámetro de > 50 μm. En el momento de la formación máxima de colonias, contar las colonias con un sistema de análisis de formación de imágenes automático (OMNICON 3600, Biosys GmbH). Teñir las colonias vitales 24 horas antes de la evaluación con una solución acuosa estéril de cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (1 mg/ml, 100 μl/pocillo).

40 Expresar los efectos de los fármacos en términos de porcentaje de formación de colonias. Comparar los números medios de colonias en los pocillos tratados con el recuento de colonias medio de los controles sin tratar (expresar el recuento de colonias relativo por el valor ensayo-frente-grupo-control, valor T/C [%]):

$$\frac{T}{C} [\%] = \frac{\text{recuento de colonias}_{\text{grupo tratado}}}{\text{recuento de colonias}_{\text{grupo control}}} \cdot 100$$

45 Representar la concentración del compuesto frente al recuento de colonias relativo y determinar los valores CI<sub>50</sub> y CI<sub>70</sub> absolutos o las concentraciones de fármacos necesarias para inhibir la formación de colonias en un 50 % (T/C = 50 %) y en un 70 % (T/C = 70 %), respectivamente por un ajuste de curva de dos puntos.

50 En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene valores CI<sub>50</sub> absolutos como se proporcionan en la Tabla 8. Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son útiles inhibiendo la proliferación de estas líneas celulares derivadas de pacientes.

Tabla 8: Xenoinjertos humanos examinados en el ensayo clonogénico

Nombre del tumor	Modelo del tumor	Histología	CI50 Absoluto (mM)
De vejiga	BXF 1218	carcinoma de células transicionales	0,048
	BXF 1228	carcinoma de células transicionales, bd	0,031
De colon	CXF 1103	adenocarcinoma, pd	>0,2
	CXF 1729	adenocarcinoma, bd	0,176
	CXF 1783	Carcinoma de colon, bd	0,029
	CXF 243	adenocarcinoma, pd	0,237
	CXF 280	adenocarcinoma, pd	0,007
	CXF 676	adenocarcinoma, md	0,35
	CXF 975	adenocarcinoma, md	0,142
	Gástrico	GXF 1172	carcinoma de células en anillo de sello, pd
GXF 209		carcinoma de células en anillo de sello, id	0,184
GXF 97		adenocarcinoma, bd	0,101
De cabeza y cuello	HNXF 536	carcinoma del epitelio escamoso, bd	0,055
	HNXF 908	carcinoma del epitelio escamoso, md	0,052
NSCLC	LXFA 1041	adenocarcinoma, md	0,205
	LXFA1584	adenocarcinoma, pd	0,085
	LXFA 526	adenocarcinoma, pd	0,084
	LXFA 629	adenocarcinoma, pd	0,026
	LXFA 983	adenocarcinoma, pd	0,103
	LXFE 1422	carcinoma del epitelio escamoso, id	0,231
	LXFE 211	carcinoma del epitelio escamoso, id	0,108
	LXFL 1072	carcinoma de pulmón de células grandes, pd	0,214
	LXFL 430	carcinoma de pulmón de células grandes, pd	0,056
	LXFL 529	carcinoma de pulmón de células grandes, pd	0,128
De mama	MAXF 1322	Adenocarcinoma papilar, pd	0,003
	MAXF 1384	adenocarcinoma, pd	0,243
	MAXF 401	Adenocarcinoma papilar, bd	0,15
	MAXF 583	adenocarcinoma del ducto, md	0,088
Melanoma	MEXF 1539	melanoma amelanótico, md	0,246
	MEXF 276	melanoma amelanótico, md	0,157
	MEXF 462	melanoma amelanótico, md	0,156
	MEXF 989	melanoma amelanótico, md	0,185
De ovario	OVXF 1353	adenocarcinoma, pd	>0,2
	OVXF 550	carcinoma	0,028
	OVXF 899	adenocarcinoma seroso papilar, md	0,59

(continuación)

Nombre del tumor	Modelo del tumor	Histología	CI50 Absoluto (mM)
De páncreas	PAXF 546	Inf., carcinoma de células escamosas mucosas	0,105
	PAXF 736	adenocarcinoma, pd	0,174
De próstata	PRXF DU145	adenocarcinoma, id	0,269
	PRXF PC3M	adenocarcinoma, metastásico, pd	0,208
Mesotelioma pleural	PXF 1752	mesotelioma pleural	0,032
	PXF 541	mesotelioma pleural invasivo	0,056
Renal	RXF 1220	hiper nefroma, pd	0,191
	RXF 393	carcinoma hipernefroide, pd	0,044
	RXF 486	adenocarcinoma hipernefroide, células claras	0,112
	RXF 631	adenocarcinoma hipernefroide, bd	0,08
Sarcoma	SXF 1186	osteosarcoma osteoblástico, md	0,11
	SXF 1301	rabdomiosarcoma maligno, id	>0,2
	SXF 627	rabdomiosarcoma pleomórfico, pd	0,095

**Modelo de leucemia E545Kp110a**

5 Creación de la línea celular de leucemia: Transducir células de hígado embrionarias derivadas de embriones transgénicos, B6.CgTg[[Igh-Myc]22Bri/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), con un retrovirus que expresa una mutación activadora clínicamente aislada de la p110 $\alpha$  humana (E545K como un cambio de aminoácido, G1633A al nivel de nucleótidos) bajo el control del LTR 5' vírico (repetición terminal larga) y que expresa GFP (proteína fluorescente verde) bajo el control del promotor PGK (MSCV6 FLAG-p110 $\alpha$  G1633A PKG/GFP) para crear células de leucemia dirigidas por objetivo. Transferir las células transducidas a un animal hospedador letalmente irradiado.

10 Las células transducidas repueblan las células madre hematopoyéticas entre la médula ósea del receptor y rescatan al animal receptor de la letalidad inducida por la radiación debida a la escisión de la médula ósea original del receptor. Observar los animales principales rescatados para el desarrollo de la leucemia a través del recuento de leucocitos monitorizado semanalmente en una pequeña cantidad de sangre (10  $\mu$ l) extraída retro-orbitalmente.

15 Extraer sangre de animales irradiados principales con leucemia confirmada y hacer pases en serie a animales hospedadores secundarios (no irradiados) para establecerlos como una línea celular de leucemia.

Animales Sujeto: Usar ratones hembra C57BL/6 (Taconic, Ciudad de Cambridge, IN), de 8 a 10 semanas de vida y de 20 a 22 g de peso, como animales receptores de leucemia. Aclimatar a los animales con una dieta baja en grasas normal (4,5 %) antes de inocular y continuar con esa dieta a discreción mientras dure el estudio. Identificar los ratones individuales de cada grupo con crotales. Inocular animales con células leucémicas de los animales donantes (día 0).

20

Modelo de leucemia singénica: A partir de un animal donante previamente inoculado con la línea celular leucémica de interés, recoger una pequeña cantidad de sangre retro-orbitalmente (10  $\mu$ l) y medir la carga de células de leucemia por recuento de leucocitos. A partir de animales con una carga leucémica suficiente, recoger sangre donante, diluir leucocitos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 500.000 por 200  $\mu$ l e inyectar 200  $\mu$ l por animal retro-orbitalmente el día 0 para iniciar la leucemia. Asignar ratones inoculados con células p110 $\alpha$ (E545K)/myc en grupos de cinco para el tratamiento con el Ejemplo 1 y un grupo de diez para un grupo control tratado con el vehículo. El día 5 hasta el día 11 después de la inoculación, dosificar cada grupo diariamente por sonda oral sólo con vehículo; Ejemplo 1 a 5, 10, 20 mg de artículo de ensayo CD por kilogramo de peso corporal (mg/kg). Recoger al menos 10  $\mu$ l de sangre retro-orbitalmente de los animales el día 12 para evaluar el progreso de la leucemia en el ensayo celular de leucemia.

25

30

Ensayo Celular de Leucemia: Recoger diez (10)  $\mu$ l de sangre completa de cada animal de estudio y procesarlos en un CoulterTQ-Prep de tal manera que se produzca la lisis de los glóbulos rojos y se fijen los leucocitos nucleados que quedan para el análisis. Analizar las células fijadas inmediatamente o conservarlas en oscuridad a 4 °C para análisis futuros. Ensayar las células por análisis de Clasificación de Células por Anticuerpos Fluorescentes (FACS) con un Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). Contar las células leucémicas en una región específica de la gráfica dispersión frontal/dispersión lateral (FS/SS) en cada muestra (definida como una región que muestra pocas células/no leucémicas en animales normales pero células leucémicas significativas en animales control de

35

leucemia). Normalizar estos datos como células leucémicas por unidad de volumen de sangre usando un límite fijo de Fluoroesferas Beckman Coulter Flow-Count por muestra (la cantidad uniforme de Fluoroesferas originalmente añadidas a cada muestra de sangre inicial donde los mismos recuentos por muestra se equipararían al mismo volumen contado por muestra).

- 5 Artículo de Ensayo: Semanalmente, mezclar el Ejemplo 1 con Hidroxietilcelulosa (HEC) al 1 %/Polisorbato 80 al 0,25 %/Antiespumante al 0,05 %/Agua purificada y someter a ultrasonidos con un ultrasonidos de sonda para suspender. Refrigerar el artículo de ensayo formulado a 4 °C y guardar en oscuridad hasta su uso (re-suspender antes de cada administración).

- 10 Análisis Estadísticos: Tabular los datos de Citometría de flujo con el software CXP de Beckman Coulter. Determinar el significado estadístico de los efectos del Ejemplo 1 con el procedimiento de Dunnett, un ANOVA de un factor que usa el grupo vehículo como el grupo control (JMP Statistical Discovery Software, SAS Institute).

- 15 En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene valores de % ICT como se proporciona en la Tabla 9. Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención inhiben el crecimiento de un tumor cuyo crecimiento dirige E545K PI3Ka mutante, una de las mutaciones de punto caliente encontradas en muchos cánceres humanos.

Tabla 9: Resultados del modelo de leucemia E545Kp110a para el Ejemplo 1

Dosis (mg/kg)	Programa	% ICT	ESM % ICT
5	cd	50,5	7,7
10	cd	76,1	5,0
20	cd	90,1	4,1
% ICT es el % de inhibición del crecimiento del tumor frente al grupo control sin tratar ESM % ICT es el error estándar de la media del % ICT			

### Modelos de Tumores de Xenoinjertos

- 20 Expandir células U87MG de glioblastoma humano y células 786-O de carcinoma renal humano en cultivo, recoger e inyectar subcutáneamente en el flanco trasero de ratones desnudos atímicos. Expandir células de cáncer pulmonar no microcítico NCI-H1975 en cultivo, recoger e inyectar subcutáneamente en el flanco trasero de ratones CD-1 nu/nu. Preparar el compuesto de ensayo en un vehículo apropiado y administrar por sonda oral cuando los tumores estén establecidos (7-21 días después del implante). La respuesta del tumor se determina por la medida del volumen del tumor realizada dos veces a la semana durante el ciclo del tratamiento. Se toma el peso corporal como una medida general de la toxicidad.
- 25

- 30 En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene valores de % ICT como se proporciona en la Tabla 10. Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención son útiles demostrando actividad anti-tumoral dependiente de la dosis en los modelos U87MG, 786-O y NCI-H 1975.

Tabla 10

Modelo de Tumor	Dosis (mg/kg)	Programa	% ICT	ESM % ICT
U87MG	3	BID	38,6	13
U87MG	6	BID	<u>57,7</u>	6,6
U87MG	10	BID	<u>86,1</u>	1,3
U87MG	12	QD	<u>53,4</u>	10,1
786-O	3	BID	<u>33,9</u>	7,8
786-O	6	BID	<u>56,9</u>	6,7
786-O	10	BID	<u>70,2</u>	4
H1975	3	BID	13,8	10,4

(continuación)

Modelo de Tumor	Dosis (mg/kg)	Programa	% ICT	ESM % ICT
H1975	6	BID	26,9	9,6
H1975	10	BID	<u>62,7</u>	7,4
% ICT es el % de inhibición del crecimiento del tumor frente al grupo sin tratar control ESM % ICT es el error estándar de la media del % ICT, y los valores subrayados indican significado estadístico.				

### Determinación de la Inhibición de Dianas *In Vivo* de PI3Ka y mTOR

5 Implantar células de glioblastoma humano U87MG ( $5 \times 10^6$ ) subcutáneamente en el flanco de ratones desnudos atímicos en 0,2 ml de matrigel. Diez días después del implante, dosificar a los ratones por vía oral de acuerdo con un protocolo cinético, de dosis única/de un solo momento o de respuesta a la dosis para la determinación de la TMED<sub>50</sub> (dosis eficaz mínima umbral). Congelar rápidamente los tumores en la recogida y extraer sangre para la determinación de la exposición de plasma al compuesto parental y el cálculo de la TMEC<sub>50</sub> (concentración eficaz mínima umbral) en el caso de estudios de respuesta a la dosis. Homogeneizar los tumores en 500  $\mu$ l de Tampón de Lisis XY (10  $\mu$ g/ml de Leupeptina/10  $\mu$ g/ml de Inhibidor de Tripsina-Quimiotripsina, 10  $\mu$ g/ml de Tosil fenilalanil clorometil cetona, 10  $\mu$ g/ml de Aprotinina, Beta-Glicerol Fosfato 60 mM, TritonX100 al 1 %, Tris 25 mM a pH 7.5, Pirofosfato 2,5 mM, NaCl 150 mM, éster de p-tosil-L-arginina metilo 2 mM, para-nitrofenil fosfato 15 mM, benzamidina 5 mM, vanadato sódico 1 mM, fluoruro sódico 10 mM, 50  $\mu$ g/ml de fluoruro de sulfonilo de fenil-metano, 1,4-ditrioleitol (DTT) 1 mM, EDTA 15 mM a pH 8,0, EGTA 5 mM a pH 8,0, Microcistina 1  $\mu$ M, Ácido Okadaico 1  $\mu$ M y 1 mini-tableta Roche Complete inhibidora de la proteasa por 10 ml) usando ARNasa Free Pellet Pestle (Kimble-Kontes). Dividir los lisados en alícuotas y ensayar inmediatamente o bien guardar a -80 °C para un ensayo posterior. Usar el formato múltiple de la tecnología ELISA Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD) y medir la inhibición de dianas *in vivo* de PI3K y de mTOR para evaluar los efectos en la fosforilación del sitio treonina 308 de AKT, un efector aguas abajo de la PI3K; la fosforilación del sitio treonina 389 de la p70 S69K y en el sitio serina 240/244 de S6RP, efectores aguas abajo de mTORC1; la fosforilación del sitio serina 473 de AKT, un efector aguas abajo de mTORC2. Añadir 20  $\mu$ g de lisado al electrodo de carbono que contiene placas de 96 pocillos previamente manchadas con los anticuerpos de captura apropiados. Ensayar la proteína de interés usando un anticuerpo de detección marcado con rutenio. Hacer pasar la corriente por encima del electrodo en presencia de tampón de lectura que contiene el co-reactivo TPA, y cuantificar y registrar la luz generada por electroquimioluminiscencia con el instrumento MSD Sector 6000. Calcular los porcentajes de inhibición con respecto al grupo control vehículo y realizar un análisis ANOVA usando el paquete de software JMP para la determinación del significado estadístico.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene la actividad como se proporciona en la Tabla 11, donde los valores subrayados indican significado estadístico. Estos resultados indican que los compuestos dentro del alcance de la presente invención demuestran la capacidad para inhibir a PI3K y a mTOR *in vivo*.

Tabla 11:

Dosis (mg/kg)	Después de la Dosis (h)	pT308 AKT % de inhibición	pS473 AKT % de inhibición	pT389 p70S6K % de inhibición	pS240/244 S6RP % de inhibición
3	0,25	28	23	77	-11
3	0,5	<u>43</u>	<u>63</u>	<u>89</u>	9
3	1	7	12	<u>89</u>	<u>51</u>
3	3	7	-7	<u>77</u>	<u>64</u>
3	4	-2	-3	<u>64</u>	37
6	0,25	47	<u>63</u>	<u>88</u>	7
6	0,5	<u>61</u>	<u>77</u>	91	26
6	1	<u>41</u>	<u>67</u>	<u>90</u>	<u>66</u>
6	2	32	51	<u>87</u>	<u>83</u>
6	4	1	-5	<u>68</u>	<u>58</u>

(continuación)

Dosis (mg/kg)	Después de la Dosis (h)	pT308 AKT % de inhibición	pS473 AKT % de inhibición	pT389 p70S6K % de inhibición	pS240/244 S6RP % de inhibición
6	6	-4	-8	61	55
6	12	-16	-6	14	-35
10	0,5	88	90	93	-4
10	1	71	73	92	69
10	2	53	66	92	89
10	4	44	56	91	95
10	8	13	13	55	16
0.5	0,5	23	-9	62	9
1.5	0,5	28	34	84	4
3	0,5	43	63	89	9
6	0,5	61	77	91	26
12	0,5	79	91	92	55
0,5	4	1	-28	7	5
1,5	4	-8	-12	38	12
3	4	-2	-3	64	37
6	4	1	-5	68	58
12	4	43	44	90	97

**Determinación de la Solubilidad**

- 5 Preparar una disolución de 2 mg/ml de Ejemplo 2 en cada uno de los medios requeridos pesando aproximadamente 1 mg de compuesto en un vial y añadir el volumen requerido (es decir 0,5 ml) del medio correspondiente en cada vial. Colocar el vial tapado en una mezcla giratoria durante toda la noche (~16 horas) en condiciones ambientales, a continuación filtrar usando filtros Ultrafree-MC de 0,22  $\mu$ m (Millipore™) y medir el pH del filtrado (pHmetro Orion 720A). Preparar la muestra para un análisis de HPLC transfiriendo 100  $\mu$ l del filtrado a un vial de HPLC y añadir 900  $\mu$ l de una disolución de acetonitrilo al 50 %/agua. Determinar la solubilidad usando el procedimiento de HPLC (fase móvil de la HPLC de 15 % de Acetonitrilo con TFA al 0,1 % y 85 % de Agua con TFA al 0,1 %; columna Bonus RP, 4,6x75 mm, 3,5  $\mu$ m; Detector a 264 nm UV; Temperatura de la Columna = 40 °C; Velocidad de Flujo 1,5 ml/min; Volumen de Inyección = 1  $\mu$ l).

Tabla 12: Resultados de la Solubilidad

Medio de Muestra	Ejemplo 2	
	mg/ml medios	pH medio
HCl 0,1N	≥ 2,0	1,15
pH 2*	≥ 2,0	2,31
pH 4*	1,0524	4,92
pH 6*	0,7178	6,14
pH 8*	0,6352	8,00
FGS*	1,7529	3,52
Fed*	≥ 2,0	5,09
Fast*	1,0203	6,45

(continuación)

<p>* pH 2 = tampón fosfato 50 mM a pH 2          pH 4 = tampón fosfato 50 mM a pH 4          pH 6 = tampón fosfato 50 mM a pH 6          pH 8 = tampón fosfato 50 mM a pH 8          FGS = Fluido gástrico simulado (Aburub et al., Int.J. of Pharmaceutics, 347:16-22, 2008).          Fed = Fluido intestinal simulado con alimento (Dressman J et al., Pharma. Res., 15(1):11-21, 1998).          Fast = Fluido intestinal simulado en ayunas (Dressman J et al., Pharma. Res., 15(1): 11-21, 1998)</p>	

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 2 se ensaya y se encuentra que tiene los resultados de solubilidad deseable sobre el pH fisiológico del tracto gastrointestinal (TGI). Esta propiedad fisicoquímica ayudará a evitar la variabilidad en la exposición en pacientes oncológicos quienes estarán en su mayoría con múltiples medicaciones tales como inhibidores de las bombas de protones (PPI) que pueden dar como resultado interacciones fármaco-fármaco con fármacos que tienen una solubilidad variable sobre el pH fisiológico del TGI. Esto se debe a que los cambios en el pH del estómago (es decir pacientes que toman o que no toman PPI o efectos alimenticios) pueden dar como resultado una variabilidad de exposición debida a las diferencias de solubilidad. La evitación de posibles interacciones fármaco-fármaco es especialmente importante en oncología, debido a los numerosos fármacos que los pacientes de cáncer normalmente reciben al mismo tiempo, la estrecha ventana terapéutica de muchos fármacos contra el cáncer y la gran variabilidad inter- e intra- individual en los pacientes. Un compuesto que tiene solubilidad deseable también evita la necesidad de formulaciones complejas y costosas que pueden usarse para aumentar la exposición sistémica requerida para la eficiencia debido a la baja solubilidad o la variabilidad de la exposición reducida debido a los efectos alimenticios y PPI.

#### Propiedades Farmacocinéticas en Perros

Los perros de raza Beagle se usan normalmente para determinar la exposición y los parámetros farmacocinéticos *in vivo* de los productos farmacéuticos. Aunque la fisiología gastrointestinal canina difiere en algunos aspectos de la de los humanos, es útil para predecir la absorción del fármaco y para identificar problemas posibles con farmacocinéticas no lineales.

Para determinar los parámetros farmacocinéticos del Ejemplo 1 en perros, a perros macho y hembra (hasta cuatro animales por dosis, en estudios separados) se le proporciona el Ejemplo 1 a través de una sonda oral en una suspensión de hidroxietilcelulosa al 1 %, polisorbato 80 al 0,25 %, antiespumante al 0,05 % en agua purificada ("suspensión HEC"). El intervalo de las dosis administradas es entre 1 y 12 mg/kg en una suspensión HEC.

Las muestras de sangre se recogen en tubos que contienen ácido etilendiaminotetracético potásico de cada perro a 0 (pre-dosis), 0,5, 1, 2, 4, 8, y 24 horas después de la dosis. Algunos estudios también incluyen muestras recogidas en los puntos de tiempo 0,25 h y 12 h. Estas muestras se centrifugan para obtener el plasma, que se congela posteriormente antes del análisis. Las muestras se someten a la precipitación proteica y los extractos se analizan para la presencia del Ejemplo 1 por cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem, usando un espectrómetro de masas PE-Sciex API4000. Las curvas patrón varían de 1 a 5000 ng/ml. Las concentraciones del plasma por encima del límite superior de cuantificación se determinan por dilución. Las concentraciones medidas del Ejemplo 1 se almacenan en Watson v.7.4, un Sistema de Gestión de Información de Laboratorio validado utilizado para guardar y gestionar datos electrónicos, y los parámetros farmacocinéticos se calculan por análisis no compartimental usando el software WATSON.

En este ciclo de ensayos se analiza un compuesto dentro del ámbito de la invención sustancialmente como se indica anteriormente. Por ejemplo, el compuesto del Ejemplo 1 se ensaya y se encuentra que tiene un valor ABC medio como se proporciona en la Tabla 13. Los valores del área bajo la curva (ABC) del Ejemplo 1 aumentan linealmente con la dosis en el intervalo de 1 a 12 mg/kg como se muestra en la tabla a continuación. El análisis de regresión lineal de los valores de ABC individuales da como resultado una correlación de determinación de  $R^2$  de 0,86 y una ecuación lineal de  $y = 1474,3x + 44,311$ . El análisis de regresión lineal de los valores de ABC medios para cada dosis da como resultado una correlación de determinación de  $R^2$  de 0,96 y una ecuación lineal de  $y = 1544,7x - 735,34$ . Estos resultados indican que los compuestos dentro del ámbito de la presente invención tienen unas propiedades farmacocinéticas en perros sobre un intervalo de dosis farmacológicamente relevante, sin evidencias de saturación



## ES 2 531 891 T3

de la absorción. Esta es una propiedad favorable para el desarrollo de fármacos y la administración clínica, permitiendo aumentos predecibles en la exposición sistémica con administración oral.

Tabla 13:

	<b>Dosis (mg/kg)</b>					
	1	3	4,5	6	9	12
ABC Medio $\pm$ Desviación Estándar (ng*h/ml)	1161 $\pm$ 440	3783 $\pm$ 2163	5920 $\pm$ 269	9620 $\pm$ 2093	10790 $\pm$ 5954	19150 $\pm$ 3465
Número de animales	10	10	2	2	2	2

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto que es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 1 que es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona.
- 5 3. El compuesto de acuerdo con la Reivindicación 2 que es 8-[5-(1-hidroxi-1-metiletil)piridin-3-il]-1-[(2S)-2-metoxipropil]-3-metil-1,3-dihidro-2H-imidazo[4,5-c]quinolin-2-ona en forma cristalina **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos-X de polvo que tiene picos característicos, en  $2\theta \pm 0,2$ , que tienen lugar a 8,57 y uno o más de 9,06, 15,93, 18,29 y 18,87.
- 10 4. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
5. El compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 para su uso en terapia.
6. El compuesto o la sal de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-3 para su uso en el tratamiento del cáncer.
- 15 7. El compuesto o la sal para su uso de acuerdo con la Reivindicación 6, en el que el cáncer es seleccionado del grupo que consiste en cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, NSCLC, cáncer de mama, melanoma, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, glioblastoma, cáncer de pulmón, cáncer renal, sarcoma, cáncer de tejido hematopoyético y linfoide, cáncer del SNC, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer tiroideo, cáncer del tracto aerodigestivo superior y cáncer urinario.