

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 624**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61P 11/00** (2006.01)  
**A61P 17/00** (2006.01)  
**A61P 19/00** (2006.01)  
**A61P 31/12** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/GB2014/050770**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140597**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14712334 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2970293**

54 Título: **Derivados de 2-((4-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona y su uso como inhibidores de fosfoinositido-3-cinasas**

30 Prioridad:

**15.03.2013 EP 13275070**  
**18.11.2013 EP 13193372**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.11.2017**

73 Titular/es:

**RESPIVERT LIMITED (100.0%)**  
**50-100 Holmers Farm Way**  
**High Wycombe, Buckinghamshire HP12 4EG, GB**

72 Inventor/es:

**ONIONS, STUART THOMAS;**  
**COPMANS, ALEX HERMAN;**  
**BROECKX, RUDY LAURENT MARIA;**  
**SMITH, ALUN JOHN y**  
**TADDEI, DAVID MICHEL ADRIEN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 640 624 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

Derivados de 2-((4-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona y su uso como inhibidores de fosfoinosítido-3-cinasas

**Campo de la invención**

La invención se refiere a compuestos que inhiben las fosfoinosítido-3-cinasas, (PI3-cinasas, PI3K). En particular, la divulgación se refiere a compuestos que inhiben el subtipo PI3K delta y, además, el subtipo gamma de las mismas, y a su uso en terapia, incluyendo en combinaciones farmacéuticas, especialmente en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo enfermedades inflamatorias del pulmón, tales como COPD y asma. La invención también se refiere a métodos de preparación de dichos compuestos y a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos.

**Antecedentes de la invención**

Las cinasas lipídicas catalizan la fosforilación de lípidos para producir especies implicadas en la regulación de una amplia gama de procesos fisiológicos, incluyendo la migración y la adhesión celulares. Las PI3-cinasas (PI3K) son proteínas asociadas a la membrana y pertenecen a la clase de enzimas que catalizan la fosforilación de lípidos que están asociados en sí mismos con membranas celulares. La isoforma PI3K delta (PI3K  $\delta$ ) es una de cuatro isoformas de las PI3K-cinasas de tipo I responsables de la generación de diversos fosfoinosítidos 3'-fosforilados, que median en la señalización celular y se han implicado en la inflamación, la señalización de factores de crecimiento, la transformación maligna y la inmunidad [véase la revisión de Rameh, L. E. y Cantley, L. C. J. Biol. Chem., 1999, 274:8347-8350].

La implicación de PI3K en el control de la inflamación se ha confirmado en varios modelos que usan inhibidores de PI3K pan-activos, tales como LY-294002 y Wortmannin [Ito, K. *et al.*, J Pharmacol. Exp. Ther., 2007, 321:1-8.]. Se han realizado estudios recientes usando o bien inhibidores de PI3K selectivos o bien en ratones deficientes que carecen de una isoforma de enzima específica tal como se describe más adelante. Estos estudios han demostrado el papel de las rutas controladas por las enzimas PI3K en la inflamación. Se encontró que el inhibidor selectivo de PI3K  $\delta$  IC-87114 inhibe la hipersensibilidad de las vías respiratorias, la liberación de IgE, la expresión de citocinas proinflamatorias, la acumulación de células inflamatorias en el pulmón y la permeabilidad vascular en ratones sensibilizados a la ovoalbúmina, expuestos a ovoalbúmina [Lee, K. S. *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol., 2006, 118:403-409 y Lee, K. S. *et al.*, FASEB J., 2006, 20:455-65.]. Además, IC-87114 redujo la acumulación de neutrófilos en los pulmones de ratones y la función neutrófila, estimulada por TNF $\alpha$  [Sadhu, C. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 308:764-9].

La isoforma PI3K  $\delta$  se activa mediante la insulina y otros factores de crecimiento, así como mediante citocinas inflamatorias y de señalización de proteínas acopladas a proteína G. Además, estudios que usaron ratones deficientes revelaron que la activación de PI3K gamma (PI3K  $\gamma$ ) puede ser importante en la patogénesis del asma. Por ejemplo, las respuestas de mastocitos murinos se agravan *in vitro* e *in vivo* mediante señales autocrinas que requieren PI3K  $\gamma$  funcional. Los ratones que carecían de PI3K  $\gamma$  no presentaban edema cuando se inducían mediante anafilaxia sistémica pasiva [Wymann M.P. *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 2003, 31:275-80.]. Por tanto, la PI3K  $\gamma$  envía señales inflamatorias a través de diversos receptores acoplados a proteína G (GPCR), especialmente controlando la función de los mastocitos. También se notificó que la acumulación de eosinófilos en ratones sensibilizados y expuestos a ovoalbúmina se inhibía en estos ratones deficientes en PI3K  $\gamma$ , en comparación con animales de tipo natural [Lim D.H. *et al.*, Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol., 2009, 296(2):L210-L219]. Finalmente, el tratamiento con un inhibidor de PI3K  $\gamma$  atenuó la contractilidad de las vías respiratorias aumentada por IL-13 de cortes pulmonares [Jiang H. *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2012, 342(2):305-11].

Recientemente, se notificó que el inhibidor de PI3K dual  $\delta/\gamma$  TG100-115 inhibe la eosinofilia pulmonar y reduce los niveles de interleucina-13, la acumulación de mucina y la hipersensibilidad de las vías respiratorias en un modelo murino, cuando se administra mediante aerosolización. Los mismos autores también notificaron que el compuesto podía inhibir la neutrofilia pulmonar provocada o bien por LPS o bien por el humo de cigarrillos [Doukas, J. *et al.*, J Pharmacol. Exp. Ther., 2009, 328:758-765.]. Se notificó que otros inhibidores de molécula pequeña de PI3K  $\delta$  y  $\gamma$  producen una inhibición superior de la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS y de activación de células T en comparación con los inhibidores selectivos de PI3K  $\delta$  [Williams O. *et al.*, Chem Biol., 2010, 17(2): 123-34.].

Dado que también se activa mediante estrés oxidativo, es probable que la isoforma PI3K  $\delta$  sea relevante como diana para la intervención terapéutica en aquellas enfermedades en las que está implicado un alto nivel de estrés oxidativo. Los mediadores en el sentido descendente de la ruta de transducción de señales de PI3K incluyen Akt (una serina/treonina proteína cinasa) y la diana de mamífero de rapamicina, la enzima mTOR. Un trabajo reciente ha sugerido que la activación de PI3K  $\delta$ , que conduce a la fosforilación de Akt, puede inducir un estado de resistencia a corticosteroides en células por lo demás sensibles a corticosteroides [To, Y. *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2010, 182:897-904.]. Estas observaciones han conducido a la hipótesis de que esta cascada de señalización puede ser un mecanismo responsable de insensibilidad a los corticosteroides de la inflamación observada en los pulmones

de pacientes que padecen COPD, así como en aquellos asmáticos que fuman, sometiendo de ese modo sus pulmones a un estrés oxidativo aumentado. De hecho, se ha sugerido que la teofilina, un compuesto usado en el tratamiento tanto de COPD como de asma, invierte la insensibilidad a esteroides a través de mecanismos que implican interacción con rutas controladas por la PI3-cinasa  $\delta$  [To, Y. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, 182:897-904.].

En la actualidad, el pilar del tratamiento tanto para el asma como para la COPD es la terapia por inhalación, usando una combinación de corticosteroides, antagonistas muscarínicos y  $\beta_2$ -agonistas, tal como se consideró clínicamente como apropiado. Una manera de abordar las necesidades médicas no cubiertas en la COPD y el asma es identificar nuevos medicamentos para inhalación, que tengan el potencial de proporcionar un beneficio significativo cuando se usan o bien como monoterapia o bien en combinación con uno o más medicamentos de estas tres clases farmacológicas. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar y desarrollar inhibidores de PI3K selectivos de isoformas que tengan el potencial de proporcionar una eficacia terapéutica potenciada en asma, COPD y otras enfermedades inflamatorias.

El documento WO 2012/052753 da a conocer: 6-(2-((4-amino-3-(3-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-3-(2-clorobencil)-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-5-il)-N,N-bis(2-metoxietil)hex-5-inamida, denominada en el presente documento compuesto A de la técnica anterior.

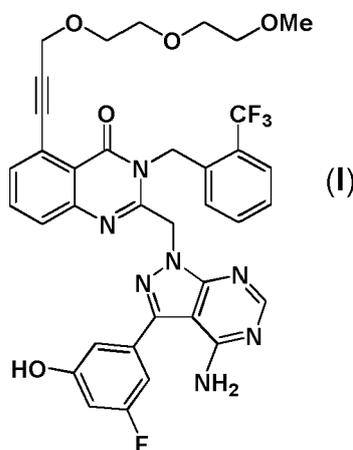
El documento WO 2011/048111 da a conocer ciertas 3-bencil-5-alquilil-quinazolin-4(3H)-onas

Un ejemplo de compuesto dado a conocer en ese documento es 2-((4-amino-3-(3-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-3-(2-fluorobencil)-5-(3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-inil)quinazolin-4(3H)-ona, denominada en el presente documento ejemplo 50.

Ninguno de estos compuestos de la técnica anterior tiene el mismo perfil ventajoso del compuesto de fórmula (I) descrito en el presente documento.

### Sumario de la invención

Según la invención, se proporciona un compuesto de fórmula (I):



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros, tautómeros y derivados isotópicos del mismo.

En otro aspecto de la invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) en forma cristalina sólida.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) en forma de su polimorfo cristalino de forma 2 (denominado en ocasiones en el presente documento "el polimorfo cristalino de forma 2").

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto de fórmula (I) en forma de su polimorfo cristalino de forma 3 (denominado en ocasiones en el presente documento "el polimorfo cristalino de forma 3").

Una comparación de los perfiles *in vitro* de los compuestos de la técnica anterior, compuesto A y ejemplo 50, con el compuesto de la presente divulgación se presenta más adelante en el presente documento (véase la tabla 5 en la sección experimental). El compuesto de la presente invención es un inhibidor de la isoforma PI3K  $\delta$  /  $\gamma$  dual particularmente potente, una característica farmacológica que le confiere un perfil terapéutico distinto y ventajoso con respecto a los compuestos dados a conocer previamente. Este aspecto de la invención resulta particularmente evidente a partir del perfil *in vivo* del compuesto de fórmula (I) en modelos animales que son factores pronóstico de

la eficacia terapéutica y el beneficio clínico en la inflamación pulmonar (véanse las tablas 8-12 en la sección experimental).

5 En una realización, el compuesto de la presente divulgación tiene una actividad inhibidora mejorada con respecto a los compuestos de la técnica anterior cuando se compara en un ensayo *in vivo* que mide la capacidad de una sustancia de prueba para inhibir el influjo inducido por poli-IC de neutrófilos al pulmón de ratón. La mejora demostrada puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces (o más) con respecto a los compuestos conocidos, dados a conocer previamente en la técnica.

10 Se considera que la actividad en el ensayo de poli-IC *in vivo* es indicativa del potencial del compuesto de la presente invención para inhibir agravamientos inducidos por virus en pacientes que padecen asma o COPD. Se cree que las infecciones víricas inducen agravamientos patológicos empeorando la inflamación en los pulmones de pacientes y generando un fenotipo resistente a los esteroides. El poli-IC estimula uno de los mecanismos a través de los cuales los virus son proinflamatorios.

15 Las propiedades de tipo farmacológico del compuesto descrito en el presente documento, incluyendo su estabilidad física y química intrínseca, el perfil de solubilidad, y especialmente su actividad biológica distintiva convierten a dicho compuesto en particularmente adecuado para su uso como agente farmacéutico y en particular para el tratamiento de enfermedades mediadas por inflamación.

20 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1a: es un gráfico de barras que representa los efectos del tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por poli-I:C en vías respiratorias de ratones.

Figura 1b: muestra una comparación de las potencias inhibidoras del compuesto (I) frente al compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por poli-I:C en vías respiratorias de ratones

30 Figura 2a: es un gráfico de barras que representa el efecto del tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de macrófagos inducida por el humo de cigarrillos en BALF murino.

Figura 2b: es un gráfico de barras que representa el efecto del tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por el humo de cigarrillos en BALF murino.

Figura 3: es un patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) obtenido de una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 (véase el ejemplo 2).

Figura 4: muestra un análisis termogravimétrico (TGA) (gráfico superior) y un análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (gráfico inferior) de una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 (véase el ejemplo 2)

Figura 5: es un patrón de XRPD obtenido de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4).

Figura 6: muestra un análisis TGA de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4).

Figura 7 muestra un análisis de DSC de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4).

Figura 8: un gráfico de isothermas de DVS para una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4).

Figura 9: es un gráfico de cambio de masa de DVS para una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4).

Figura 10: muestra patrones de XRPD obtenidos antes (gráfico inferior) y después (gráfico superior) del análisis de DVS en una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 (véase el ejemplo 4)

Figura 11: muestra patrones de XRPD de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 obtenidos antes (gráfico inferior) y después de 1 semana de almacenamiento a 25°C/el 96% de HR (gráfico central) y a 40°C/el 75% de HR (gráfico superior) (véase el ejemplo 4).

65

Figura 12: es un patrón de XRPD obtenido de una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 (véase el ejemplo 8).

Figura 13: muestra un análisis TGA (gráfico superior) y de DSC (gráfico inferior) de una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 (véase el ejemplo 8).

Figura 14: es un análisis de GVS en una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 (véase el ejemplo 8).

Figura 15: muestra patrones de XRPD obtenidos antes (gráfico inferior) y después (gráfico superior) de un análisis de GVS en una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 (véase el ejemplo 8).

Figura 16: muestra patrones de XRPD de una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 obtenidos antes (gráfico inferior) y después de 1 semana de almacenamiento a 25°C/el 96% de HR (gráfico central) y a 40°C/el 75% de HR (gráfico superior) (véase el ejemplo 8).

Figura 17: muestra una superposición de patrones de XRPD obtenidos de muestras de la forma 7 (gráfico superior), forma 6, forma 5, forma 4, forma 3, forma 2 y forma 1 (gráfico inferior) (véanse los ejemplos 9 a 12).

## Descripción detallada de la invención

El término inhibidor tal como se emplea en el presente documento pretende hacer referencia a un compuesto que reduce (por ejemplo en al menos el 10%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50% o más) o elimina la actividad biológica de la proteína diana, por ejemplo la isozima PI3K  $\delta$ , en un ensayo enzimático *in vitro*.

El término inhibidor delta/gamma ( $\delta/\gamma$ ) tal como se emplea en el presente documento pretende hacer referencia al hecho de que el compuesto inhibe, en cierto grado, la actividad inhibidora en ambas isoformas enzimáticas aunque no necesariamente en la misma medida.

El compuesto de la presente divulgación es activo en sistemas de examen basados en células y de ese modo demuestra que presenta propiedades adecuadas para penetrar en las células y puede ejercer efectos farmacológicos intracelulares (véanse la tabla 6 y la tabla 7 en la sección experimental).

El compuesto de la presente divulgación tiene propiedades farmacéuticas terapéuticamente relevantes y deseables para un medicamento, por ejemplo características fisicoquímicas que incluyen una fotoestabilidad y estabilidad química adecuadas, un perfil de solubilidad apropiado y una actividad potente.

En una realización se proporciona una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la invención.

En una realización se proporciona una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del compuesto de la invención.

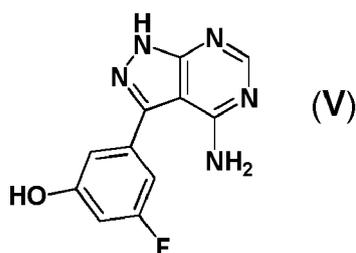
Se pretende que las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables a las que se hizo referencia anteriormente en el presente documento comprendan las sales de adición de ácido terapéuticamente activas, no tóxicas, que puedan formar los compuestos de fórmula (I). Estas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden obtenerse convenientemente tratando la forma de base libre del compuesto de fórmula (I) con un ejemplo de tales ácidos apropiados. Los ejemplos de ácidos apropiados incluyen, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, y ácidos sulfúrico y fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, propanoico, hidroxiaacético, láctico, malónico, succínico, maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, *para*-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, *para*-aminosalicílico, pamoico y similares. Un ejemplo adicional de un ácido apropiado es ácido bencenosulfónico.

Los ejemplos de sales del compuesto de fórmula (I) incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables, tales como, sin limitación, sales de adición de ácido de ácidos minerales tales como sales de HCl y HBr y sales de adición de ácidos orgánicos tales como una sal de ácido metanosulfónico. Los ejemplos adicionales incluyen sales de ácido sulfúrico y sales de ácido fosfórico.

En otra realización se proporciona una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto de la invención formada haciendo reaccionar el compuesto de fórmula (I) con una base adecuada. Los ejemplos de bases apropiadas incluyen, por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de magnesio, hidróxido de calcio, L-arginina, colina y L-lisina.

En una realización se proporciona 2-((4-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-(3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-in-1-il)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona como base libre.



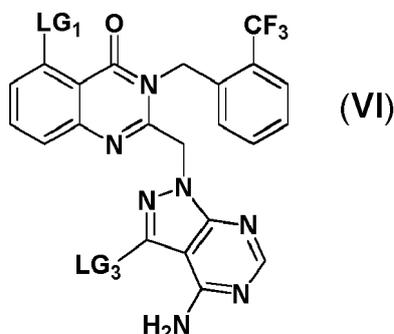


o un derivado protegido del mismo, en presencia de un base y en un disolvente aprótico polar.

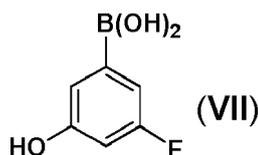
- 5 Las bases adecuadas para esta transformación incluyen carbonato de potasio y un disolvente aprótico polar adecuado es DMF.

10 Los procesos de síntesis incluyen aquéllos para los que se considera ventajoso proteger el hidroxilo fenólico del compuesto de fórmula (VII) durante la etapa de acoplamiento y los derivados protegidos adecuados incluyen un *terc*-butildimetilsilil éter y un *terc*-butil éter.

Alternativamente pueden prepararse compuestos de fórmula (II) haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (VI):



15 o un derivado protegido del mismo, en el que LG<sub>1</sub>, es tal como se definió anteriormente para compuestos de fórmula (II) y LG<sub>3</sub> representa un grupo saliente tal como halógeno, en particular yodo, con un compuesto de fórmula (VII):



20 o un derivado protegido del mismo, en presencia de un catalizador de metal noble adecuado, una base inorgánica y en un disolvente prótico polar, bajo una atmósfera inerte; seguido, cuando sea apropiado, por desprotección.

25 Un catalizador adecuado es tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0).

Una base inorgánica adecuada es carbonato de sodio y un disolvente prótico polar adecuado es etanol.

30 La reacción puede realizarse a una temperatura elevada, por ejemplo a 85°C durante un periodo prolongado tal como, por ejemplo, 3 días antes de enfriar hasta TA.

35 Los grupos protectores pueden ser ventajosos para enmascarar grupos químicamente sensibles durante una o más de las secuencias de reacción descritas anteriormente, para garantizar que uno o más de los procesos son eficaces. Por tanto, si se desea o es necesario, pueden protegerse los compuestos intermedios mediante el uso de grupos protectores convencionales. Grupos protectores y medios para su eliminación se describen en "Protective Groups in Organic Synthesis", de Theodora W. Greene y Peter G.M. Wuts, publicado por John Wiley & Sons Inc; 4th Rev Ed., 2006, ISBN-10: 0471697540.

Los productos intermedios novedosos se reivindican como un aspecto de la invención.

40 Ventajosamente, el compuesto (I) de la presente invención no presenta atropisomerismo.

El compuesto (I) preparado según el ejemplo 2 de esta divulgación se produce como el polimorfo cristalino de forma 1. El polimorfo cristalino de forma 1 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 3.

5 Se encontró que el comportamiento térmico de una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 era complejo. Tal como se comenta en el ejemplo 2 y se ilustra en el análisis de DSC mostrado en la Figura 4 (gráfico inferior), una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 se sometió a varios eventos de calentamiento, y en última instancia se transformó en un polimorfo cristalino diferente - denominado en el presente documento polimorfo cristalino de forma 2.

10 Se encontró que el polimorfo cristalino de forma 2 era anhidro y se fundía con descomposición a aproximadamente 190°C (máximo pico). Los experimentos de suspensión realizados en el polimorfo cristalino de forma 1 condujeron a la formación del polimorfo cristalino de forma 2 para la mayoría de los disolventes, aunque un polimorfo cristalino anhidro - denominado en el presente documento polimorfo cristalino de forma 3, se obtuvo suspendiendo el  
15 polimorfo cristalino de forma 1 en diclorometano. Se encontró que el polimorfo cristalino de forma 3 era anhidro y se fundía con descomposición a aproximadamente 186°C (máximo pico; véase el ejemplo 8). También se obtuvieron varios pseudopolimorfos del compuesto (I) (pseudopolimorfos de forma 4, 5, 6 y 7) a partir de la suspensión del polimorfo cristalino de forma 1 o del compuesto (I) en forma amorfa con THF, 1,4-dioxano, agua al 10%/acetonitrilo o agua al 10%/acetona (véanse los ejemplos 9 a 12).

20 De las siete formas polimórficas y pseudopolimórficas diferentes del compuesto (I), los polimorfos cristalinos de forma 2 y forma 3 tenían las propiedades de estado sólido más prometedoras, siendo el polimorfo cristalino de forma 2 el más favorable debido a que tiene el punto de fusión más alto.

25 Se realizaron experimentos de suspensión competitiva usando una mezcla 50/50 de los polimorfos cristalinos de forma 2 y forma 3 en diversos disolventes a diversas temperaturas (véase el ejemplo 13). Todos los experimentos dieron como resultado el polimorfo cristalino de forma 2, lo que confirma que éste es la forma termodinámicamente más estable. Dado que es deseable minimizar el riesgo de interconversión de formas polimórficas durante el almacenamiento del compuesto y la fabricación de productos farmacéuticos que contienen el compuesto, o durante  
30 la vida útil de un producto de este tipo tras la fabricación, el polimorfo cristalino de forma 2 tiene ventajas con respecto al polimorfo cristalino de forma 3 y otras formas polimórficas del compuesto (I).

De manera adecuada, el polimorfo cristalino de forma 2 se prepara cristalizando el compuesto (I) en una disolución en 1-propanol. En el ejemplo 3 se describen procedimientos a modo de ejemplo que usan 1-propanol, con y sin  
35 siembra.

El polimorfo cristalino de forma 2 también puede prepararse suspendiendo el polimorfo cristalino de forma 1 en metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, acetato de isopropilo, TBME, 2-butanona, DMSO, dietil éter, MIBK, heptano, nitrometano, agua al 10%/etanol, agua al 10%/acetonitrilo o agua al  
40 10%/2-propanol.

Alternativamente, el polimorfo cristalino de forma 2 puede prepararse suspendiendo el compuesto (I) en forma amorfa en metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, acetato de isopropilo, TBME, 2-butanona, DMSO, dietil éter, MIBK, nitrometano, agua al 10%/etanol o agua al 10%/2-propanol.  
45

Los experimentos de los inventores han mostrado que suspender el compuesto (I) en forma amorfa, en diclorometano, conduce a la formación del polimorfo cristalino de forma 3. Por tanto, debe evitarse el uso de diclorometano en condiciones de cristalización previstas para formar el polimorfo cristalino de forma 2.

50 Los experimentos de los inventores han mostrado que suspender el compuesto (I) en forma amorfa o el polimorfo cristalino de forma 1, en THF, conduce a la formación del pseudopolimorfo de forma 4. Por tanto, debe evitarse el uso de THF en condiciones de cristalización previstas para formar el polimorfo cristalino de forma 2.

Los experimentos de los inventores han mostrado que suspender el compuesto (I) en forma amorfa o el polimorfo cristalino de forma 1, en 1,4-dioxano, conduce a la formación del pseudopolimorfo de forma 5. Por tanto, debe evitarse el uso de 1,4-dioxano en condiciones de cristalización previstas para formar el polimorfo cristalino de forma 2.  
55

Los experimentos de los inventores han mostrado que suspender el compuesto (I) en forma amorfa en agua al 10%/acetonitrilo conduce a la formación del pseudopolimorfo de forma 6. Por tanto, debe evitarse el uso de agua al 10%/acetonitrilo en condiciones de cristalización previstas para formar el polimorfo cristalino de forma 2 a partir del compuesto (I) en forma amorfa.  
60

Los experimentos de los inventores han mostrado que suspender el compuesto (I) en forma amorfa en agua al 10%/acetona conduce a la formación del pseudopolimorfo de forma 7. Por tanto, debe evitarse el uso de agua al  
65

10%/acetona en condiciones de cristalización previstas para formar el polimorfo cristalino de forma 2 a partir del compuesto (I) en forma amorfa.

5 El polimorfo cristalino de forma 2 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 5. Este patrón tiene picos principales en las posiciones 8,2, 9,0, 9,2, 9,7, 12,2, 14,1, 14,3, 15,0, 16,4, 18,0, 18,5, 19,0, 19,6, 21,8, 22,3, 22,5, 24,3, 24,5, 24,8, 25,1 y 25,8 ( $\pm 0,2$  grados, valores 2-theta). Es típico que al menos tres (por ejemplo tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o los veintiuno) de éstos pueden observarse en el patrón de XRPD resultante. Los picos en 9,7, 12,2, 14,1 y 14,3 son particularmente característicos para el polimorfo cristalino de forma 2 y por tanto es típico que al menos uno (por ejemplo uno, dos, tres o los cuatro) de estos picos puedan observarse en el patrón de XRPD.

15 El polimorfo cristalino de forma 3 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 12.

El pseudopolimorfo de forma 4 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 17.

20 El pseudopolimorfo de forma 5 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 17.

El pseudopolimorfo de forma 6 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 17.

25 El pseudopolimorfo de forma 7 se caracteriza por un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 17.

En un aspecto, el compuesto es útil en el tratamiento, por ejemplo de COPD y/o asma.

30 Los compuestos de PI3K desarrollados hasta la fecha se han previsto normalmente para su administración oral. Normalmente, esta estrategia implica la optimización del perfil farmacocinético de un compuesto con el fin de conseguir una duración de acción adecuada. De esta manera se establece y se mantiene una concentración de fármaco suficientemente alta entre dosis para proporcionar un beneficio clínico continuo. Una consecuencia inevitable y frecuentemente no deseada de este enfoque es que es probable que tejidos corporales no seleccionados como diana, especialmente el hígado y los intestinos, se expongan a concentraciones farmacológicamente activas del fármaco.

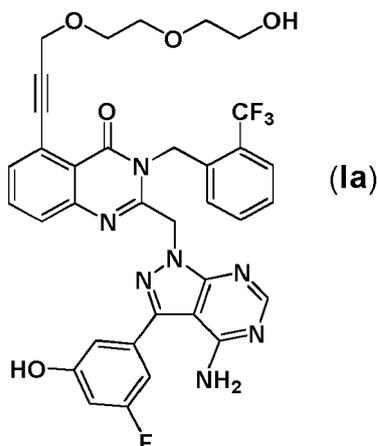
35 Una estrategia alternativa es diseñar regímenes de tratamiento en los que el fármaco se dosifica directamente al órgano inflamado (por ejemplo terapia tópica). Aunque este enfoque no es adecuado para tratar todos los estados inflamatorios crónicos, se ha aprovechado de manera extensa en el tratamiento de enfermedades pulmonares (asma, COPD, fibrosis quística), lesiones cutáneas (dermatitis atópica y psoriasis), enfermedades nasales (rinitis alérgica), enfermedad ocular (conjuntivitis alérgica) y trastornos gastrointestinales (colitis ulcerosa).

40 En la terapia tópica, la eficacia deseada puede conseguirse en ocasiones garantizando que el fármaco tiene una duración de acción sostenida y se retiene predominantemente en el órgano diana, minimizando de ese modo los riesgos de toxicidad sistémica. Alternativamente puede usarse una formulación apropiada que genera un "reservorio" del fármaco activo que está entonces disponible para sostener los efectos deseados. El primer enfoque se muestra a modo de ejemplo en el uso del fármaco anticolinérgico bromuro de tiotropio (Spiriva HandiHaler®), que se administra por vía tópica al pulmón como tratamiento para la COPD. Este compuesto tiene una afinidad excepcionalmente alta para su receptor objetivo, dando como resultado una tasa de desactivación (tasa de disociación) muy lenta y una consecuente duración de acción sostenida.

45 Según un aspecto de la presente divulgación se proporciona el uso del compuesto de fórmula (I) o una formulación farmacéutica que lo contiene, como inhibidor de PI3-kinasa, administrada por ejemplo por vía tópica al pulmón.

50 Por tanto, en una realización se pretende que el compuesto de la presente divulgación sea para su uso mediante la administración tópica a los pulmones con el fin de maximizar el beneficio terapéutico para los pacientes, al tiempo que minimiza el potencial de efectos sistémicos no deseados. Por tanto resulta ventajoso que el compuesto de fórmula (I) se metabolice rápidamente una vez que ha alcanzado la circulación general y que el/los producto(s) de recambio es/son menos activos que la molécula original.

55 Un producto probablemente principal de metabolismo de primer paso del compuesto de fórmula (I) es el alcohol correspondiente, compuesto (Ia), que se produciría de la O-desmetilación, un proceso metabólico que es una característica común para estructuras de este quimiotipo. Este posible producto metabólico es significativamente menos activo que el compuesto de fórmula (I) como inhibidor de PI3K en los subtipos tanto  $\alpha$  como  $\beta$  (véase la tabla 6 en la sección experimental).



5 Por tanto, en un aspecto se proporciona un compuesto de fórmula (Ia) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros, tautómeros y derivados isotópicos del mismo.

En un aspecto de la divulgación, el compuesto de la invención es particularmente adecuado para su suministro tópico, tal como suministro tópico a los pulmones, en particular para el tratamiento de COPD.

10 Por tanto, en un aspecto se proporciona el uso de un compuesto de la invención para el tratamiento de COPD y/o asma, en particular COPD o asma grave, mediante la inhalación, es decir, mediante la administración tópica al pulmón. Ventajosamente, la administración al pulmón permite implementar los efectos beneficiosos de los compuestos, al tiempo que se minimizan los efectos secundarios, para pacientes.

15 En una realización, los compuestos son adecuados para sensibilizar pacientes con respecto al tratamiento con un corticosteroide.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la divulgación opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

20 Los diluyentes y portadores pueden incluir aquéllos adecuados para su administración parenteral, oral, tópica, mucosa y rectal, y pueden ser diferentes dependiendo de la vía de administración.

25 En una realización pueden prepararse composiciones por ejemplo para administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular o periarticular, particularmente en forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para su administración oral, particularmente en forma de comprimidos o cápsulas; para administración tópica por ejemplo pulmonar o intranasal, particularmente en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles y administración transdérmica; para administración mucosa por ejemplo a la mucosa bucal, sublingual o vaginal, y para administración rectal por ejemplo en forma de un supositorio. En otra realización pueden prepararse composiciones para administración oral en forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para administración

30 tópica en forma de disoluciones líquidas, suspensiones líquidas, gotas nasales que comprenden disoluciones o suspensiones o aerosoles presurizados o no presurizados.

35 Las composiciones pueden administrarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos ampliamente conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo tal como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las composiciones también pueden administrarse convenientemente en múltiples formas de dosificación unitaria.

40 Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes agua estéril o solución salina, alquilenglicoles tales como propilenglicol, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares.

45 Las formulaciones para administración nasal pueden ser sólidas y pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa o dextrano, o pueden ser disoluciones acuosas o aceitosas para su uso en forma de gotas nasales o una pulverización medida. Las formulaciones para administración nasal también pueden estar en forma de suspensiones acuosas. Para la administración bucal, los excipientes típicos incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares.

50 Las composiciones adecuadas para administración oral pueden comprender uno o más portadores y/o excipientes fisiológicamente compatibles y pueden estar en forma sólida o líquida. Pueden prepararse comprimidos y cápsulas

con agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, tales como lactosa, sacarosa, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes, tales como estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; y tensioactivos, tales como laurilsulfato de sodio. Las composiciones líquidas pueden contener aditivos convencionales tales como agentes de suspensión, por ejemplo jarabe de sorbitol, metilcelulosa, jarabe de azúcar, gelatina, carboximetilcelulosa o grasas comestibles; agentes emulsionantes tales como lecitina o goma arábica; aceites vegetales tales como aceite de almendra, aceite de coco, aceite de hígado de bacalao o aceite de cacahuetes; conservantes tales como hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Las composiciones líquidas pueden encapsularse en, por ejemplo, gelatina para proporcionar una forma de dosificación unitaria.

Las formas de dosificación oral sólidas incluyen comprimidos, cápsulas de envuelta dura de dos piezas y cápsulas de gelatina elástica blanda (SEG). Tales cápsulas de envuelta dura de dos piezas pueden prepararse a partir de, por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).

Una formulación de envuelta seca comprende normalmente una concentración de aproximadamente el 40%-60% de gelatina, una concentración de aproximadamente el 20%-30% de plastificante (tal como glicerina, sorbitol o propilenglicol) y una concentración de agua de aproximadamente el 30%-40%. También pueden estar presentes otros materiales tales como conservantes, colorantes, opacificantes y aromas. El material de carga líquido comprende un fármaco sólido que se ha disuelto, solubilizado o dispersado (con agentes de suspensión tales como cera de abejas, aceite de ricino hidrogenado o polietilenglicol 4000) o un fármaco líquido en vehículos o combinaciones de vehículos tales como aceite mineral, aceites vegetales, triglicéridos, glicoles, polioles y agentes tensioactivos.

De manera adecuada, el compuesto de fórmula (I) se administra por vía tópica al pulmón. Por tanto, en una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o portadores aceptables por vía tópica.

La administración tópica al pulmón puede conseguirse mediante el uso de una formulación de aerosol. Las formulaciones de aerosol comprenden normalmente el principio activo suspendido o disuelto en un propelente de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarburo (CFC) o un hidrofluorocarburo (HFC). Los propelentes de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propelente 11), diclorotetrafluorometano (propelente 114) y diclorodifluorometano (propelente 12). Los propelentes de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propelente comprende normalmente el 40%-99,5%, por ejemplo el 40%-90% en peso de la composición para inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen codisolventes (por ejemplo etanol) y tensioactivos (por ejemplo lecitina, trioleato de sorbitano y similares). Otros excipientes posibles incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y similares. Las formulaciones de aerosol se envasan en recipientes y una dosis adecuada se suministra por medio de una válvula de dosificación (por ejemplo tal como se suministra por Bepak, Valois o 3M o alternativamente por Aptar, Coster o Vari).

La administración tópica al pulmón también puede conseguirse mediante el uso de una formulación no presurizada tal como una disolución o suspensión acuosa. Éstas pueden administrarse por medio de un nebulizador, por ejemplo uno que puede ser manual y portátil o para uso doméstico u hospitalario (es decir, no portátil). La formulación puede comprender excipientes tales como agua, tampones, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes de ajuste del pH, tensioactivos y codisolventes. Las formulaciones de aerosol y líquidas en suspensión (ya sean presurizadas o no presurizadas) contendrán normalmente el compuesto de la invención en una forma finamente dividida, por ejemplo con un  $D_{50}$  de 0,5-10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo de aproximadamente de 1-5  $\mu\text{m}$ . Las distribuciones de tamaño de partícula pueden representarse usando valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  y  $D_{90}$ . La mediana del valor de  $D_{50}$  de distribuciones de tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micras que divide la distribución por la mitad. La medición derivada de la difracción láser se describe de manera más exacta como distribución de volumen, y por consiguiente el valor  $D_{50}$  obtenido usando este procedimiento se denomina de manera más significativa valor de  $Dv_{50}$  (mediana para una distribución de volumen). Tal como se usa en el presente documento, los valores de  $Dv$  se refieren a distribuciones de tamaño de partícula medidas usando difracción láser. De manera similar, se considera que los valores  $D_{10}$  y  $D_{90}$ , usados en el contexto de la difracción láser, significan valores de  $Dv_{10}$  y  $Dv_{90}$  y hacen referencia al tamaño de partícula, por lo cual el 10% de la distribución se encuentra por debajo del valor de  $D_{10}$ , y el 90% de la distribución se encuentra por debajo del valor de  $D_{90}$ , respectivamente.

La administración tópica al pulmón también puede conseguirse mediante el uso de una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el compuesto de la divulgación en una forma finamente dividida, normalmente con un diámetro medio de la masa (MMAD) de 1-10  $\mu\text{m}$  o un  $D_{50}$  de 0,5-10  $\mu\text{m}$ , por ejemplo de aproximadamente 1-5  $\mu\text{m}$ . Los polvos del compuesto de la invención en una forma finamente dividida pueden prepararse mediante un proceso de micronización o un proceso de reducción del tamaño similar. La micronización puede realizarse usando un molino de chorro tal como los fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución de tamaño de partícula resultante puede medirse usando difracción láser (por ejemplo con un instrumento Malvern Mastersizer 2000S). La formulación contendrá normalmente un diluyente aceptable por vía tópica tal como lactosa, glucosa o manitol (preferiblemente lactosa), habitualmente de un tamaño de partícula comparativamente grande, por ejemplo un diámetro medio de la masa (MMAD) de 50  $\mu\text{m}$  o más, por ejemplo de 100  $\mu\text{m}$  o más o un  $D_{50}$  de 40-

150  $\mu\text{m}$ . Tal como se usa en el presente documento, el término "lactosa" se refiere a un componente que contiene lactosa, incluyendo  $\alpha$ -lactosa monohidratada,  $\beta$ -lactosa monohidratada,  $\alpha$ -lactosa anhidra,  $\beta$ -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de lactosa pueden procesarse mediante micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por pulverización. También están abarcadas las formas de lactosa disponibles comercialmente en diversas formas, por ejemplo los productos Lactohale<sup>®</sup> (lactosa de calidad para inhalación; DFE Pharma), Inha-Lac<sup>®</sup>70 (lactosa tamizada para un inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose<sup>®</sup> (DFE Pharma) y Respitose<sup>®</sup> (lactosa de calidad para inhalación tamizada; DFE Pharma). En una realización, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en  $\alpha$ -lactosa monohidratada,  $\alpha$ -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Preferiblemente, la lactosa es  $\alpha$ -lactosa monohidratada.

Las formulaciones de polvo seco también pueden contener otros excipientes tales como estearato de sodio, estearato de calcio o estearato de magnesio.

Una formulación de polvo seco se suministra normalmente usando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI). Los sistemas de suministro de polvo seco de ejemplo incluyen SPINHALER<sup>®</sup>, DISKHALER<sup>®</sup>, TURBOHALER<sup>®</sup>, DISKUS<sup>®</sup>, SKYHALER<sup>®</sup>, ACCUHALER<sup>®</sup> y CLICKHALER<sup>®</sup>. Los ejemplos adicionales de sistemas de suministro de polvo seco incluyen ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, el inhalador de polvo seco ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

En una realización se proporciona un compuesto de la presente invención como formulación de polvo seco micronizado, por ejemplo que comprende lactosa de una calidad adecuada, cargada en un dispositivo tal como DISKUS. De manera adecuada, un dispositivo de este tipo es un dispositivo multidosis, por ejemplo la formulación se carga en blísteres para su uso en un dispositivo de múltiples dosis unitarias tal como DISKUS.

En una realización se proporciona un compuesto de la presente invención como formulación de polvo seco micronizado, que comprende lactosa de una calidad adecuada y estearato de magnesio, cargada en blísteres para su uso en un dispositivo multidosis tal como DISKUS. De manera adecuada, un dispositivo de este tipo es un dispositivo multidosis.

En otra realización se proporciona un compuesto de la presente invención como formulación de polvo seco micronizado, por ejemplo que comprende lactosa de una calidad adecuada, cargada en cápsulas de envuelta dura para su uso en un dispositivo monodosis tal como AEROLISER.

En otra realización se proporciona un compuesto de la presente invención como formulación de polvo seco micronizado, que comprende lactosa de una calidad adecuada y estearato de magnesio, cargada en cápsulas de envuelta dura para su uso en un dispositivo monodosis tal como AEROLISER.

Las composiciones a modo de ejemplo del compuesto (I) que son adecuadas para su uso en un inhalador de polvo seco se enumeran en el ejemplo 15.

Se pretende que los compuestos según la divulgación tengan actividad terapéutica. En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la divulgación para su uso como medicamento.

Los compuestos según la divulgación también pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos respiratorios que incluyen COPD (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrica, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis, sinusitis y agravamientos inducidos por virus de una cualquiera de las mismas, infección respiratoria vírica, especialmente asma, bronquitis crónica y COPD.

Los virus respiratorios incluyen influenza, virus respiratorio sincitial, virus de la parainfluenza humana, coronavirus de SARS y adenovirus. Un ejemplo adicional de un virus respiratorio es rinovirus.

El compuesto de la divulgación también puede volver a sensibilizar el estado del paciente al tratamiento con un corticosteroide, cuando previamente el estado del paciente había dejado de responder al mismo.

En una realización de la invención se emplea una dosis del presente compuesto que es igual a la que es adecuada para su uso como monoterapia, pero administrada en combinación con un corticosteroide.

En una realización se emplea una dosis del compuesto de fórmula (I) que sería subterapéutica como agente único, en combinación con un corticosteroide, restableciendo de ese modo la capacidad de respuesta del paciente a este último, en casos en los que el paciente había dejado de responder previamente al mismo.

En una realización se emplea una dosis del compuesto de fórmula (I), en combinación con una dosis de corticosteroide que sería subterapéutica si se administra en ausencia del compuesto de fórmula (I), restableciendo

de ese modo la capacidad de respuesta del paciente al corticosteroide, en casos en los que el paciente había dejado de responder previamente al mismo.

5 Adicionalmente, el compuesto de la divulgación puede presentar actividad antivírica y, por ejemplo, demostrar utilidad en el tratamiento de agravamientos víricos de estados inflamatorios tales como asma y/o COPD.

10 El compuesto de la presente divulgación también puede ser útil en la profilaxis, el tratamiento o la mejora de una enfermedad o las complicaciones de una enfermedad asociadas con el virus influenza, rinovirus y/o virus respiratorio sincitial.

15 En una realización se proporciona un compuesto de fórmula (I) para su uso en el tratamiento o la prevención de una infección vírica o complicaciones inflamatorias inducidas por infección vírica.

20 Según la divulgación también se espera que el compuesto de fórmula (I) sea útil en el tratamiento de ciertos estados que pueden tratarse mediante terapia tópica o local incluyendo conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto, psoriasis, colitis ulcerosa, articulaciones inflamadas derivadas de artritis reumatoide u osteoartritis.

25 En una realización, el compuesto de fórmula (I) se considera útil en el tratamiento de la hepatitis C y/o VIH, cuando se administra mediante una vía apropiada. Las vías de administración apropiadas pueden incluir vía oral, inyección intravenosa o infusión.

30 En una realización, el compuesto de fórmula (I) para el tratamiento de la hepatitis C se suministra justo antes de la entrada de la sangre al hígado.

35 También se espera que el compuesto de la divulgación sea útil en el tratamiento de otros ciertos estados que incluyen artritis reumatoide, pancreatitis, caquexia, inhibición del crecimiento y metástasis de tumores incluyendo carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinomas colorrectales y melanoma maligno.

40 En una realización, el compuesto dado a conocer en el presente documento y las formulaciones farmacéuticas que comprenden el mismo son útiles en el tratamiento o la prevención de cáncer, en particular cáncer de pulmón, especialmente mediante la administración tópica al pulmón.

45 Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona el compuesto tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de uno o más de los estados mencionados anteriormente.

50 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona el uso del compuesto tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de uno o más de los estados mencionados anteriormente.

55 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de tratamiento de los estados mencionados anteriormente que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del compuesto de la divulgación o una composición farmacéutica del mismo.

60 El compuesto descrito en el presente documento también puede usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una o más de las enfermedades identificadas anteriormente.

65 La palabra "tratamiento" pretende abarcar la profilaxis así como el tratamiento terapéutico.

El compuesto de la divulgación también puede administrarse en combinación con uno o más de otros principios activos, por ejemplo principios activos adecuados para tratar los estados mencionados anteriormente. Por ejemplo, las combinaciones posibles para el tratamiento de trastornos respiratorios incluyen combinaciones con corticosteroides (por ejemplo budesonida, dipropionato de beclometasona, propionato de fluticasona, furoato de mometasona, furoato de fluticasona), beta-agonistas (por ejemplo terbutalina, salbutamol, salmeterol, formoterol, indacaterol), xantinas (por ejemplo teofilina), antagonistas muscarínicos, (por ejemplo ipratropio) y/o un inhibidor de la p38 MAP cinasa. Un ejemplo adicional de un corticosteroide adecuado es ciclesonida o flunisolida. De manera adecuada, el beta-agonista es un beta2-agonista. Ejemplos adicionales de beta2-agonistas son reproterol, vilanterol, olodaterol, reproterol y fenoterol. Los ejemplos adicionales de antagonistas muscarínicos incluyen tiotropio, umeclidinio, glicopirronio, aclidinio y daratropio, cualquiera de éstos por ejemplo como la sal de bromuro. Una posible combinación adicional para el tratamiento de trastornos respiratorios es el compuesto de la divulgación y un inhibidor de fosfodiesterasas.

En una realización, el compuesto de la divulgación se administra en combinación con un agente antivírico, por ejemplo aciclovir, oseltamivir, zanamavir (Relenza<sup>®</sup>) o interferón.

En una realización, la combinación de principios activos se formula conjuntamente.

5 En una realización, el compuesto de la presente divulgación se formula conjuntamente con un corticosteroide como formulación para inhalación, por ejemplo para su uso en la terapia de mantenimiento de COPD o cáncer de pulmón incluyendo la prevención de este último.

En una realización, la combinación de principios activos simplemente se administra conjuntamente.

10 En una realización se proporciona un producto de combinación que comprende:

(A) un compuesto de la presente divulgación; y

15 (B) un principio activo adicional seleccionado por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos, inhibidores de fosfodiesterasas e inhibidores de p38 MAP cinasa (seleccionado por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos e inhibidores de p38 MAP cinasa).

20 en el que cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en una mezcla con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. La combinación puede comprender opcionalmente excipientes relevantes adicionales. De manera adecuada, el beta-agonista es un beta2-agonista.

25 En una realización se proporciona un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 para su uso como medicamento que debe administrarse en combinación con uno o más principios activos adicionales seleccionados por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos e inhibidores de p38 MAP cinasa. De manera adecuada, el beta-agonista es un beta2-agonista.

En una realización, el compuesto de la divulgación se administra mediante inhalación y un corticosteroide se administra por vía oral o mediante inhalación ya sea en combinación o por separado.

30 En una realización, el compuesto de la divulgación se administra mediante inhalación y un beta2-agonista se administra por vía oral o mediante inhalación ya sea en combinación o por separado.

### Sección experimental

35 Las abreviaturas usadas en el presente documento se definen a continuación (tabla 1). Cualquier abreviatura no definida pretende expresar su significado aceptado generalmente.

Tabla 1: Abreviaturas

Aq	acuoso
Ac	acetilo
ACD	ácido-citrato-dextrosa
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BALF	fluido de lavado broncoalveolar
a	ancho
BSA	albúmina sérica bovina
COPD	enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CXCL1	ligando 1 de quimiocinas de motivo CXC
CXCL8	ligando 8 de quimiocinas de motivo CXC
d	doblete
DCM	diclorometano
DMA	dimetilacetamida
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	dimetilsulfóxido
EDC.HCl	clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
(ES <sup>+</sup> )	ionización por electrospray, modo positivo
Et	etilo
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
FACS	clasificación de células activadas por fluorescencia
FCS	suero de ternero fetal
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FP	propionato de fluticasona
HPLC-MS	cromatografía de líquidos de alto rendimiento con espectrometría de masas
h	hora(s)
HRP	peroxidasa del rábano

IFN $\gamma$	interferón-gamma
i-n	intranasal
i-t	intratraqueal
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-13	interleucina 13
IL-17	interleucina 17
LPS	lipopolisacárido
IPA	isopropanol [propan-2-ol]
M	molar
(M+H) <sup>+</sup>	ión molecular protonado
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos
MDA	malondialdehído
Me	metilo
MeOH	metanol
MHz	megahercios
min	minuto(s)
MIBK	metil isobutil cetona
MOMA-2	anticuerpo anti-monocitos y macrófagos
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
m/z	relación masa/carga
NH <sub>4</sub> OAc	acetato de amonio
nm	nanómetro
NMP	N-metilpirrolidona
RMN	resonancia magnética nuclear (espectroscopía)
OVA	ovoalbúmina
PBMC	célula(s) mononuclear(es) de sangre periférica
PBS	solución salina tamponada con fosfato
Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	tris(dibencilidenacetona)dipaladio (0)
PdCl <sub>2</sub> (PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	dicloruro de bis(trifenilfosfino)paladio (II)
Ph	fenilo
PIP2	4,5-bifosfato de fosfatidilinositol
PIP3	3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol
PMA	acetato-miristato de forbol
po	mediante administración oral
PPh <sub>3</sub>	trifenilfosfina
q	cuartete
quin	quintete
R <sup>t</sup>	tiempo de retención
HR	humedad relativa
TA	temperatura ambiente
RP-HPLC	cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
s	singlete
SDS	dodecilsulfato de sodio
EEM	error estándar de la media
t	triplete
TBME	metil <i>tert</i> -butil éter
THF	tetrahidrofurano
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
TR-FRET	transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo

#### Procedimientos generales

5 Todos los materiales de partida y disolventes se obtuvieron o bien de fuentes comerciales o bien se prepararon según las referencias de la bibliografía. A menos que se indique lo contrario, todas las reacciones fueron con agitación. Las disoluciones orgánicas se secaron de manera rutinaria sobre sulfato de magnesio anhidro.

La cromatografía en columna se realizó en cartuchos de sílice preempquetados (230-400 de malla, 40-63  $\mu$ m) usando la cantidad indicada.

10

#### Métodos analíticos

##### *LCMS analítica*

Se llevó a cabo una LCMS analítica usando una columna Waters Xselect CSH C<sub>18</sub> de 3,5 μm (4,6 x 50 mm) con un caudal de 2,5-4,5 ml min<sup>-1</sup> eluyendo con un gradiente de H<sub>2</sub>O-MeCN que contiene el 0,1% v/v de ácido fórmico a lo largo de 4 min. Información de gradiente: 0-3,00 min, con una variación de desde el 95% de H<sub>2</sub>O-5% de MeCN hasta el 5% de H<sub>2</sub>O-95% de MeCN; 3,00-3,01 min, mantenido al 5% de H<sub>2</sub>O-95% de MeCN, caudal aumentado hasta 4,5 ml min<sup>-1</sup>; 3,01-3,50 min, mantenido al 5% de H<sub>2</sub>O-95% de MeCN; 3,50-3,60 min, de vuelta al 95% de H<sub>2</sub>O-5% de MeCN, caudal reducido hasta 3,50 ml min<sup>-1</sup>; 3,60-3,90 min, mantenido al 95% de H<sub>2</sub>O-5% de MeCN; 3,90-4,00 min, mantenido al 95% de H<sub>2</sub>O-5% de MeCN, caudal reducido hasta 2,5 ml min<sup>-1</sup>. Se detectaron las fracciones que contenían la muestra mediante su absorbancia de UV a 254 nm. Se midieron los espectros de masa de los picos eluidos usando un espectrómetro de masas cuadrupolar Agilent 6120 que funcionaba en los modos de electrospray de iones positivo y negativo mixtos.

#### *Espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN*

Se obtuvieron espectros de <sup>1</sup>H-RMN en un espectrómetro Bruker Avance III a 400 MHz usando el disolvente no deuterado residual como referencia y a menos que se especifique lo contrario se ejecutaron en DMSO-d<sub>6</sub>.

#### *Difracción de rayos X de polvo - método 1 (usando un difractómetro Brucker AXS C2 GADDS)*

Se recogieron patrones de difracción usando radiación Kα de Cu (40 kV, 40 mA), fase XYZ automatizada, videomicroscopio láser para autoposicionamiento de muestras y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consistía en un único espejo multicapa Göbel acoplado con un colimador de agujero de 0,3 mm. La divergencia de haz, es decir, el tamaño efectivo del haz de rayos X en la muestra era de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo θ-θ con una distancia de muestra-detector de 20 cm, que dio un intervalo de 2θ efectivo de 3,2°-29,7°. Normalmente se expuso la muestra al haz de rayos X durante 120 segundos. El software usado para la recopilación de datos fue GADDS para XP/2004 4.1.43 y los datos se analizaron y se presentaron usando Diffrac Plus EVA v13.0.0.2 o v15.0.0.0. Se prepararon muestras ejecutadas en condiciones ambientales como especímenes en placa plana usando el polvo tal como se recibió sin molienda. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se prensó ligeramente sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana. Se montaron muestras ejecutadas en condiciones no ambientales en una oblea de silicio con un compuesto termoconductor. La muestra se calentó entonces hasta la temperatura apropiada a 20°C/min y posteriormente se mantuvo de manera isotérmica durante 1 minuto antes de iniciar la recopilación de datos.

#### *Difracción de rayos X de polvo - método 2 (usando un difractómetro Brucker AXS D8 advance)*

Se recogieron patrones de difracción usando radiación Kα de Cu (40 kV, 40 mA), un goniómetro θ-2θ, y divergencia de V4 y rendijas de recepción, un monocromador Ge y un detector Lynxeye. El software usado para la recopilación de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v2.6.1 y los datos se analizaron y se presentaron usando Diffrac Plus EVA v13.0.0.2 o v15.0.0.0. Las muestras se ejecutaron en condiciones ambientales como especímenes en placa plana usando el polvo tal como se recibió. La muestra se empaquetó suavemente en una cavidad cortada en una oblea de silicio pulida, sin fondo (510). La muestra se hizo rotar en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recopilación de datos son: intervalo angular: de 2 a 42° 2θ; tamaño del escalón: 0,05° 2θ; tiempo de recogida: 0,5 s/escalón.

#### *Difracción de rayos X de polvo - método 3 (usando un difractómetro PANalytical (Philips) X'PertPRO MPD)*

Se equipó el instrumento con un tubo de rayos X LFF de Cu. El compuesto se extendió sobre un portamuestras sin fondo. Los parámetros de instrumento usados son los siguientes: voltaje del generador: 45 kV; amperaje del generador: 40 mA; geometría: Bragg-Brentano; fase: fase de disco. Las condiciones de medición fueron las siguientes: modo de barrido: continuo; intervalo de barrido: de 3 a 50° 2θ; tamaño de escalón: 0,02°/escalón; tiempo de recuento: 30 s/escalón; tiempo de revolución del disco: 1 s; tipo de radiación: CuKα. Los parámetros de trayectoria del haz incidente fueron tal como sigue: rendija de divergencia program.: 15 mm; rendija Soller: 0,04 rad; máscara de haz: 15 mm; rendija antidispersión: 1°; cuchillo de haz: +. Los parámetros de trayectoria de haz difractado fueron tal como sigue: pantalla antidispersión larga: +; rendija Soller: 0,04 rad; filtro de Ni: +; detector: X'Celerator.

#### *Calorimetría diferencial de barrido - método 1 (usando un instrumento Mettler DSC 823e)*

Un instrumento Mettler DSC 823E está equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la energía y la temperatura usando indio certificado. Normalmente 0,5-3 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con agujeros, se calentaron a 10°C/min desde 25°C hasta 300°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control de instrumento y de análisis de datos era STARE v9.20.

#### *Calorimetría diferencial de barrido - método 2 (usando un instrumento TA-Instruments Q 1000 MTDSC equipado con una unidad de enfriamiento RCS)*

Se cerró una bandeja de muestra TA-Instruments con la cubierta apropiada y se registró la curva de DSC en un instrumento TA-Instruments Q1000 MTDSC equipado con una unidad de enfriamiento RCS. Se usaron los siguientes parámetros: temperatura inicial: 25°C; velocidad de calentamiento: 10°C/min; temperatura final: 250°C.

5 *Análisis termogravimétrico - método 1 (usando un instrumento Mettler TGA/SDTA 851e)*

Los datos TGA se recogieron en un instrumento Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un automuestreador de 34 posiciones. El instrumento se calibró para la temperatura usando indio certificado. Normalmente se cargaron 5 - 30 mg de cada muestra en un crisol de aluminio pesado previamente y se calentaron a 10°C/min desde temperatura ambiental hasta 350°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control de instrumento y de análisis de datos era STARe v9.20.

*Análisis termogravimétrico (TGA) - método 2 (usando un termogravímetro TA-Instruments Q500 TGA)*

15 Los datos de TGA se recogieron en un termogravímetro TA-Instruments Q500 TGA. El compuesto se transfirió a una bandeja de muestra de aluminio antes de analizarse usando los siguientes parámetros: temperatura inicial: temperatura ambiente; velocidad de calentamiento: 20°C/min; factor de resolución: 4; condición final: 350°C o <80% (p/p)].

20 *Sorción gravimétrica de vapor (GVS)*

Se obtuvieron isothermas de sorción usando un analizador de sorción de humedad SMS DVS Intrinsic, controlado mediante el software DVS Intrinsic Control v1.0.1.2 (o v 1.0.1.3). La temperatura de la muestra se mantuvo a 25°C mediante los controles de instrumento. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un caudal total de 200 ml/min. La humedad relativa se midió mediante una sonda Rotronic calibrada (intervalo dinámico del 1,0 - 100% de HR), ubicada cerca de la muestra. El cambio de peso (relajación másica) de la muestra en función del % de HR se monitorizó constantemente mediante la microbalanza (precisión de ±0,005 mg). Normalmente se pusieron 5 - 20 mg de muestra en una cesta de acero inoxidable de malla tarada en condiciones ambientales. La muestra se cargó y se descargó al 40% de HR y 25°C (condiciones ambiente típicas). Se realizó una isoterma de sorción de humedad tal como se esboza más adelante (dando 4 barrido 2 ciclos completos). Se realizó la isoterma convencional a 25°C a intervalos del 10% de HR a lo largo de un intervalo del 0 - 90% de HR. El análisis de datos se realizó en Microsoft Excel usando DVS Analysis Suite v6.2 (o 6.1 ó 6.0).

Tabla 2: Parámetros de método para experimentos con SMS DVS Intrinsic

Parámetros	Valores
Adsorción - barridos 1 y 3	40-90
Desorción/Adsorción - barridos 2 y 4	90-0, 0-40
Intervalos (% de HR)	10
Número de barridos	4
Caudal (ml/min)	200
Temperatura (°C)	25
Estabilidad (°C/min)	0,2
Tiempo de sorción (horas)	6 horas de temporización

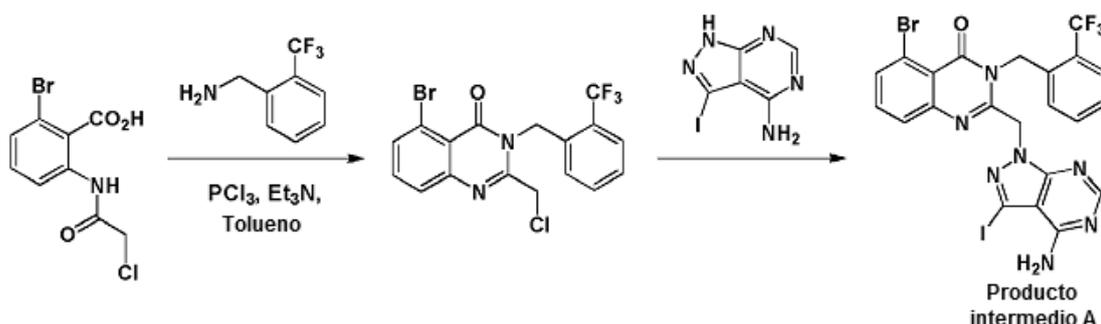
La muestra se recuperó tras completar la isoterma y se volvió a analizar mediante XRPD.

*Sorción dinámica de vapor (DVS)*

40 Se transfirieron aproximadamente 20 mg del compuesto a una sorción dinámica de vapor SMS y se registró el cambio de peso con respecto a la humedad atmosférica a 25°C usando los siguientes parámetros: secado: 60 min bajo nitrógeno seco; equilibrio: 60 min; puntos de medición de la HR (%): ciclo 1: 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5; ciclo 2: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 0.

Ejemplo 1 - Preparación del compuesto (I) y del compuesto (Ia)

50 Producto intermedio A: 2-((4-Amino-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona.

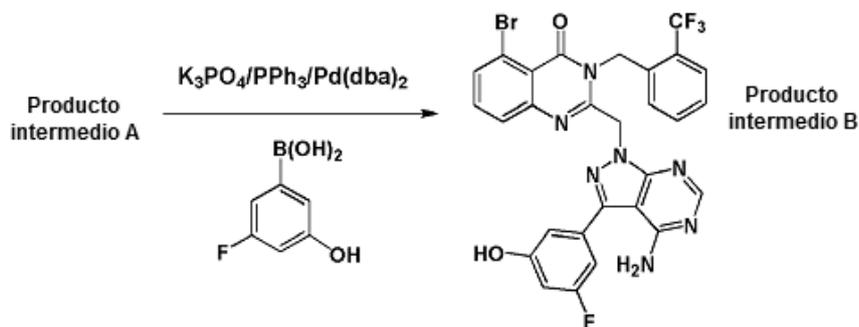


5 A una mezcla agitada de ácido 2-bromo-6-(2-cloroacetamido)benzoico [King-Underwood *et al.*, documento WO2011/048111] (50,0 g, 171 mmol), (2-(trifluorometil)fenil)metanamina (29,4 ml, 205 mmol) y trietilamina (34 ml, 430 mmol) en tolueno (1,2 l) a -1°C se le añadió una disolución de tricloruro de fósforo (37 ml, 430 mmol) en tolueno (100 ml) gota a gota a lo largo de 1 h, tiempo durante el cual se mantuvo la temperatura interna por debajo de 5°C. Se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 2,5 h y entonces se filtró la suspensión resultante mientras estaba todavía caliente. Se retuvo el filtrado y se suspendió el sólido recogido en tolueno nuevo (100 ml), y se calentó hasta 90°C con agitación vigorosa. Se eliminó el sólido mediante filtración y entonces se combinaron los extractos orgánicos que contenían el producto bruto.

10 Se preparó un segundo lote de este material repitiendo la reacción en condiciones idénticas a la misma escala. Se evaporaron a vacío los filtrados combinados de ambas reacciones y se trituró el residuo con IPA (2 x 400 ml). El material bruto así obtenido se secó a vacío para producir 5-bromo-2-(clorometil)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona como un sólido blanquecino (100 g, 90% de pureza mediante HPLC, 61%);  $R^t$  2,70 min;  $m/z$  431/433 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

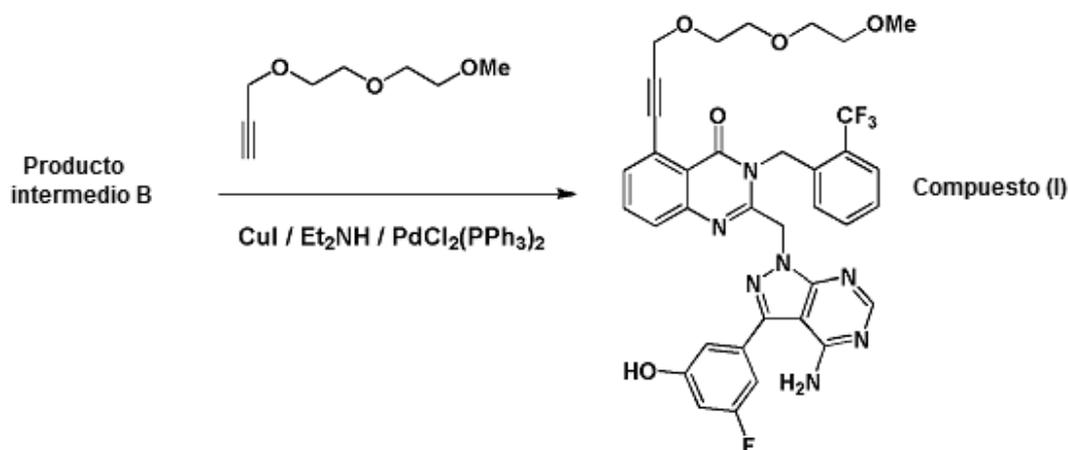
15 A una disolución de la quinazolinona, obtenida tal como se describió anteriormente, (100 g, 90% de pureza, 210 mmol) y 3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (50,4 g, 193 mmol) en DMF (600 ml) a TA se le añadió carbonato de potasio (80,0 g, 580 mmol) y tras 18 h se vertió la mezcla de reacción en agua (1,2 l). El precipitado resultante se recogió mediante filtración, y se lavó secuencialmente con agua (500 ml), con EtOAc (600 ml) y finalmente con Et<sub>2</sub>O (400 ml). La torta resultante se secó a vacío para producir el compuesto del título, el producto intermedio A, como un sólido blanquecino (115 g, 89%);  $R^t$  2,28 min,  $m/z$  656/658 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

25 Producto intermedio B: 2-((4-Amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona.



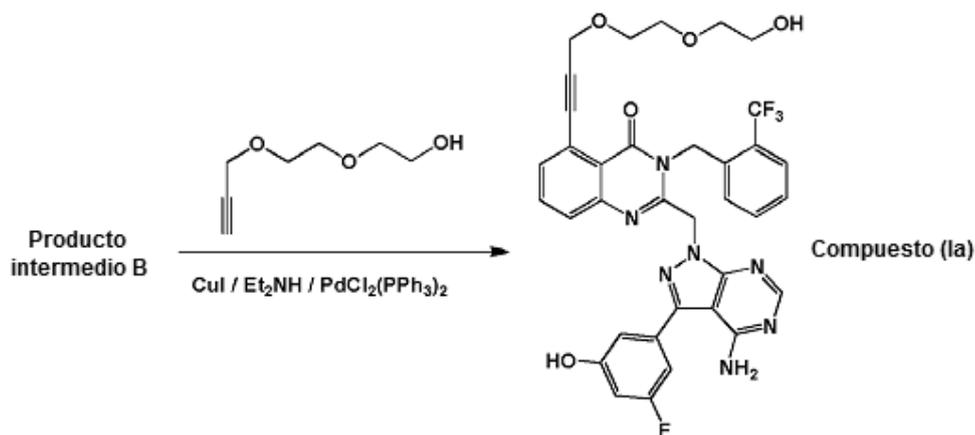
30 A una disolución del producto intermedio A (54,4 g, 83,0 mmol), ácido (3-fluoro-5-hidroxifenil)borónico (15,5 g, 99,0 mmol) y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (19,1 g, 83,0 mmol) en 1-butanol (900 ml) se le burbujeó nitrógeno a TA durante 20 min. Se trató la mezcla con PPh<sub>3</sub> (3,26 g, 12,4 mmol) y con Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (1,90 g, 2,07 mmol) y se burbujeó con nitrógeno durante 10 min más y entonces se calentó hasta 90°C bajo un flujo de nitrógeno. Tras 40 h se enfrió la mezcla hasta 70°C y se le añadió agua (250 ml) gota a gota. Se enfrió la mezcla hasta 50°C durante 3 h y entonces hasta TA durante 3 días, tiempo durante el cual se formó un precipitado beis. El sólido se recogió mediante filtración, se lavó con 1-butanol (2 x 100 ml) y con agua (2 x 100 ml) y entonces se secó a vacío a 40°C para producir el compuesto del título, el producto intermedio B, como un sólido blanquecino (35,2 g, 65%);  $R^t$  2,25 min,  $m/z$  640/642 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>).

40 Compuesto (I): 2-((4-Amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-(3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-in-1-il)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona.



Una suspensión del producto intermedio B (35,2 g, 55,0 mmol), 3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-ino [King-Underwood *et al.*, documento WO2011/048111], (17,4 g, 110 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (3,86 g, 5,50 mmol) y yoduro de cobre (I) (1,05 g, 5,50 mmol) en una mezcla de Et<sub>2</sub>NH y DMF (4:1 v/v, 820 ml) se burbujeó con nitrógeno a TA durante 10 min. Se calentó la mezcla hasta 65°C durante 1,5 h y entonces se enfrió hasta TA. Se evaporaron los volátiles a vacío y se repartió el residuo entre EtOAc (600 ml) y NH<sub>4</sub>OAc aq. sat. (650 ml). Se separó la fase acuosa y se extrajo con EtOAc (300 ml) y se evaporaron las fases orgánicas combinadas a vacío para producir un aceite viscoso marrón oscuro. Se le añadió metanol (200 ml) y se agitó la mezcla a TA durante 16 h. Se formó un precipitado amarillo que se recogió mediante filtración y se lavó con MeOH (100 ml). Se purificó el sólido resultante mediante en columna ultrarrápida en dos lotes separados (SiO<sub>2</sub>, 330 g, MeOH en DCM, 0-6%, elución en gradiente). Se llevaron juntos los materiales purificados a una mezcla de DCM/MeOH (10:1 v/v) para dar una disolución homogénea que entonces se evaporó y se secó a vacío para producir el compuesto del título, el compuesto (I), como un sólido blanquecino (20,1 g, 51%); R<sub>t</sub> 2,15 min, m/z 718 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-RMN δ: 3,19 (3H, s), 3,35-3,38 (2H, m solapante), 3,44-3,49 (4H, m solapante), 3,60-3,63 (2H, m solapante), 4,37 (2H, s), 5,49 (2H, s), 5,76 (2H, s), 6,42 (1 H, d), 6,65 (1 H, m), 6,73 (1 H, m), 6,79 (1 H, m), 7,15 (1 H, t), 7,28 (1 H, t), 7,52 (1 H, d), 7,65-7,69 (2H, m solapante), 7,82 (1 H, m), 8,12 (1 H, s), 10,15 (1 H, s)

Compuesto (Ia): 2-((4-Amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-(3-(2-(2-hidroxietoxi)etoxi)prop-1-in-1-il)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona.

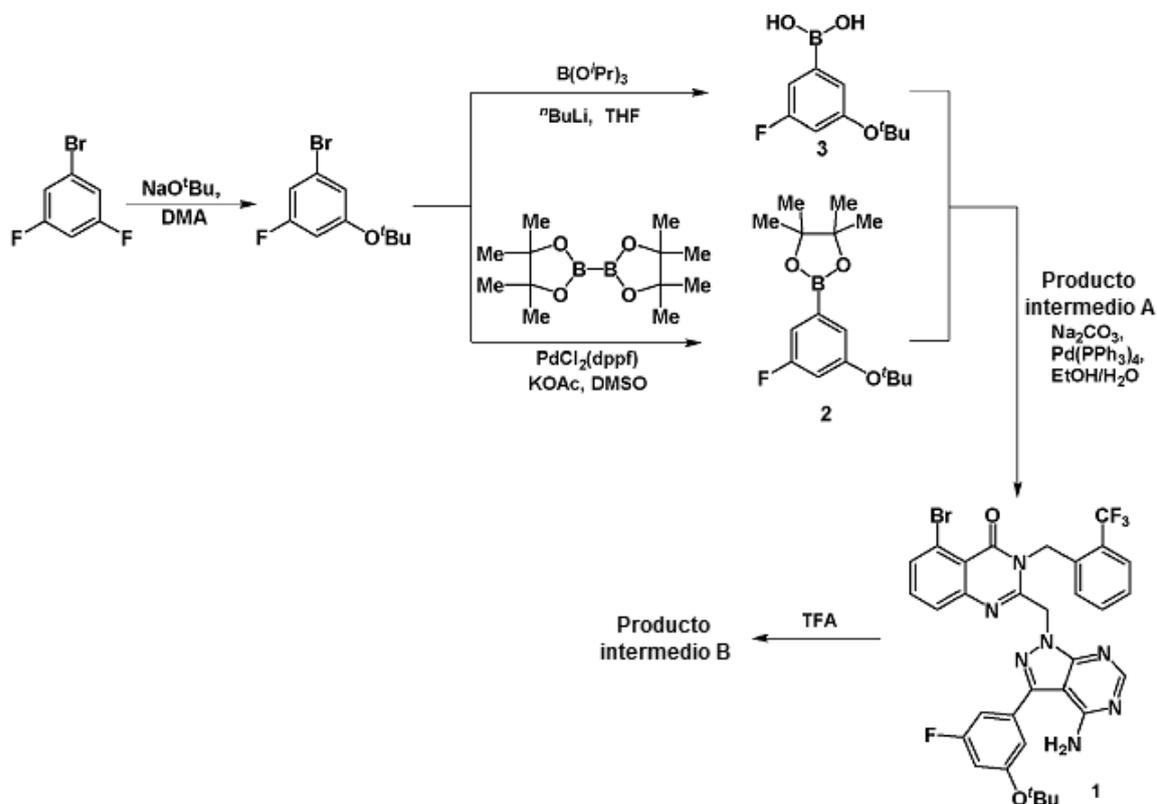


Una suspensión del producto intermedio B (190 mg, 0,297 mmol), 2-(2-(prop-2-in-1-ilo)etoxi)etanol [King-Underwood *et al.*, documento WO2011/048111] (257 mg, 0,890 mmol), PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (208 mg, 0,297 mmol) y yoduro de cobre (I) (57 mg, 0,30 mmol) en una mezcla de Et<sub>2</sub>NH y DMF (4:1 v/v, 7,5 ml) se desgasificó con N<sub>2</sub> y entonces se calentó hasta 60°C durante 16 h. La mezcla de reacción se enfrió hasta TA y se evaporó a vacío sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO<sub>2</sub>, 12 g, MeOH en DCM, 0-5%, elución en gradiente) para producir el compuesto del título, el compuesto (Ia), como un sólido tostado pálido (30 mg, 14%); R<sub>t</sub> 1,88 min, m/z 704 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-RMN δ: 3,36-3,50 (6H, m solapante), 3,61-3,63 (2H, m solapante), 4,37 (2H, s), 4,58 (1H, m), 5,48 (2H, s), 5,76 (2H, s), 6,41 (1H, d), 6,64 (1H, m), 6,72 (1H, d), 6,78 (1H, s), 7,14 (1H, t), 7,27 (1H, t), 7,52 (1H, d), 7,65-7,71 (2H, m solapante), 7,82 (1H, t), 8,13 (1H, s), 10,19 (1 H, s a).

Basándose en el análisis de compuestos estructuralmente similares (véase el documento WO2011/048111), se considera muy improbable que el compuesto (I) presente atropisomerismo. La complejidad y las consecuencias adicionales para el desarrollo de fármacos que resultan del atropisomerismo son análogas a las que surgen de otras fuentes de isomerismo molecular tal como la presencia de un centro estereogénico. Esta propiedad convierte tales moléculas tanto en quirales como, a menos que se resuelvan, en una mezcla racémica; cuyos componentes pueden tener perfiles farmacológicos y toxicológicos diferentes. Es probable que esta característica aumente significativamente los costes de desarrollo posterior para tales moléculas, y la ausencia de atropisomerismo en el compuesto (I) es por tanto una propiedad sumamente deseable y ventajosa.

10 Ejemplo 2 - Preparación del compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 1

Se preparó el compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 1 partiendo del producto intermedio B, que puede prepararse como se resume en el siguiente esquema:

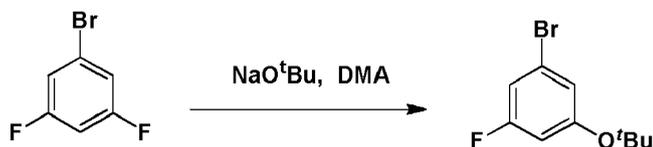


15

La preparación de los productos intermedios se expone a continuación.

20 *1-Bromo-3-(terc-butoxi)-5-fluorobenceno*

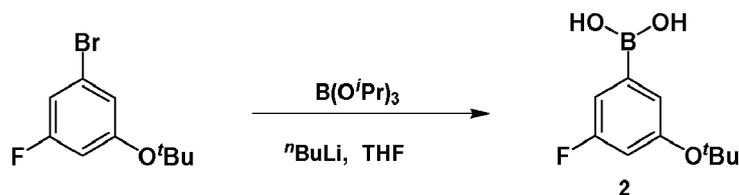
20



A DMA enfriada con hielo (2,0 l) se le añadió *terc*-butóxido de sodio (284 g, 3,89 moles) en porciones seguido por la adición gota a gota de 1-bromo-3,5-difluorobenceno (298 ml, 2,59 moles). Tras completar la adición se calentó la mezcla hasta TA y se agitó durante 72 h. Se añadió agua (200 ml) y se filtró el precipitado gomoso resultante. Se concentró el sobrenadante a vacío y se purificó el residuo mediante destilación a vacío. El aceite resultante se disolvió en dietil éter (1,0 l), se lavó con agua (6 x 250 ml), se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró a vacío para dar el compuesto del título como un aceite incoloro (220 g, 881 mmol, 34,0%): p.e. 84-86°C (8 mbar); <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,35 (9H, s), 6,64 (1H, dt), 6,92-6,96 (2H, m solapante).

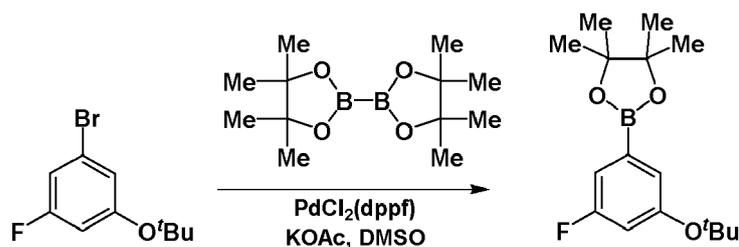
30

*Ácido (3-(terc-butoxi)-5-fluorofenil)borónico; 2*



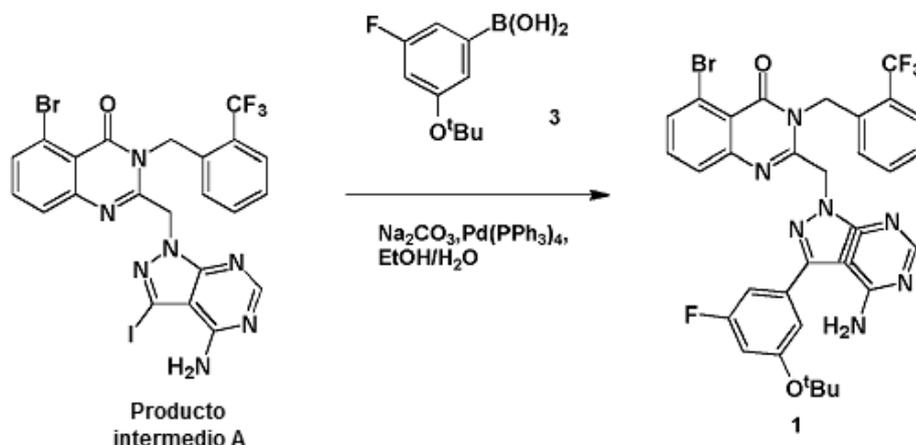
A una disolución de 1-bromo-3-(*terc*-butoxi)-5-fluorobenceno (75,0 g, 304 mmol) en THF (1,0 l) se le añadió *n*-butil-litio (2,5 M en hexanos, 150 ml, 337 mmol) gota a gota at -78°C. Se agitó la mezcla resultante a esta temperatura durante 45 min y entonces se añadió gota a gota borato de triisopropilo (105 ml, 455 mmol). Se agitó la mezcla a esa temperatura durante 1,5 h, y entonces se calentó hasta -5°C a lo largo de 1,5 h. Se diluyó la mezcla con dietil éter (1,0 l) y disolución aq de HCl 1 M (450 ml) y se separaron las fases. Se extrajo la fase acuosa con dietil éter adicional (2 x 250 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y entonces se evaporaron a vacío para dar un aceite amarillo pálido. El aceite se redisolvió en *iso*-hexanos (300 ml) y se concentró de nuevo para producir un sólido pegajoso blanquecino. El sólido se trituroó con *iso*-hexanos (150 ml) y se filtró para producir un polvo blanco. Se repartió el material entre NaOH 2 M (600 ml) y dietil éter (600 ml). Se recogió la fase acuosa y se extrajo la orgánica con NaOH adicional (2 x 200 ml). Una cantidad significativa de material no era soluble y éste se filtró, se lavó con dietil éter (se confirmó como producto limpio mediante LCMS). Se enfrió la fase acuosa básica en un baño de hielo y se acidificó hasta pH 1 con HCl conc. (~ 130 ml). Se extrajo la fase acuosa con DCM (3 x 300 ml) y las fases orgánicas se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron a vacío para dar un polvo beis. Éste se trituroó con *iso*-hexanos (100 ml) para producir producto limpio adicional. Los dos lotes se combinaron para dar el compuesto del título 2 como un polvo blanquecino (17,2 g, 73,0 mmol, 24,1 %): R<sub>t</sub>: 1,87 min.

2-(3-(*terc*-Butoxi)-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano; 3



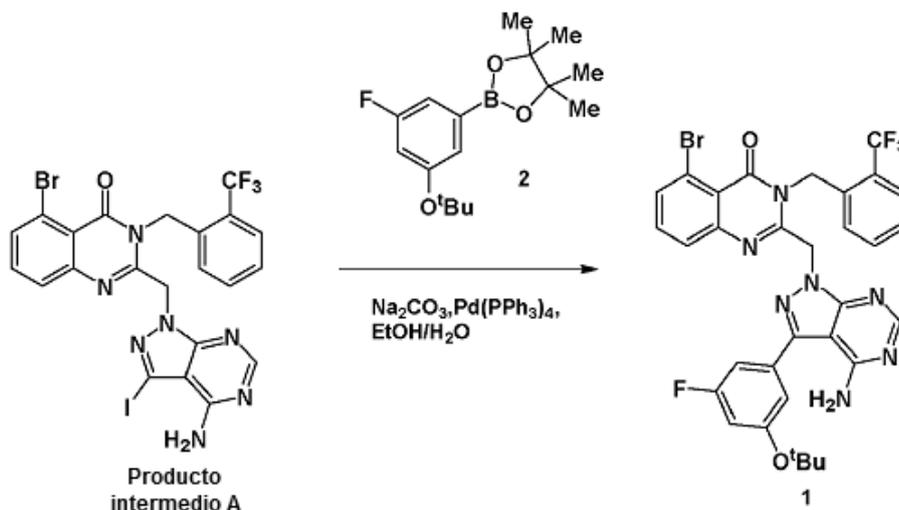
Se lavó con nitrógeno una mezcla de dicloruro de paladio (II)-1,1'-*bis*(difenilfosfino)ferroceno (6,81 g, 9,31 mmol), acetato de potasio (54,8 g, 558 mmol) y 4,4,4',4',5,5,5',5'-octametil-2,2'-*bi*(1,3,2-dioxaborolano) (52,0 g, 205 mmol) y a esto se le añadió una disolución de 1-bromo-3-(*terc*-butoxi)-5-fluorobenceno (46,0 g, 186 mmol) en DMSO (528 ml). La mezcla resultante se sonicó durante 3 minutos, se desgasificó durante 5 minutos y se calentó a 80°C durante 23 h. La mezcla de reacción se repartió entre dietil éter (500 ml) y agua (500 ml). Se extrajo la fase acuosa con dietil éter adicional (3 x 400 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron (MgSO<sub>4</sub>), se filtraron y se evaporaron a vacío para dar un residuo marrón oscuro. Este residuo se disolvió en una mezcla de *iso*-hexanos/EtOAc, se filtró a través de un tapón corto de sílice y se evaporó a vacío para dar un sólido marrón claro. El sólido residuo se adsorbió previamente sobre sílice y se purificó mediante cromatografía en columna, (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 0-4% EtOAc en *iso*-hexanos, elución en gradiente) para dar el compuesto del título 3 como un sólido blanco (27,0 g, 87,0 mmol, 46,8%): <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 1,31 (12H, s), 1,34 (9H, s), 6,78 (1H, m), 7,17-7,20 (2H, m solapante).

2-((4-Amino-3-(3-(*terc*-butoxi)-5-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona; 1 (a partir de ácido borónico, 3)



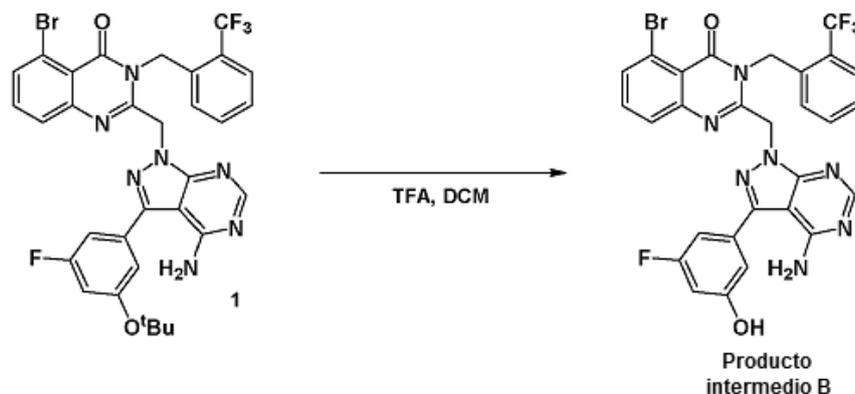
Se desgasificó con nitrógeno una mezcla de producto intermedio A (2 x 10,0 g, 14,9 mmol), ácido (3-(*tert*-butoxi)-5-fluorofenil)borónico 3 (2 x 3,17 g, 14,9 mmol), carbonato de sodio decahidratado (2 x 6,75 g, 23,6 mmol) y *tetrakis*-trifenilfosfina de paladio (2 x 0,52 g, 0,45 mmol) en una mezcla de EtOH/agua (9:1, 2 x 500 ml), se sonicó durante 10 min y entonces se agitó a 65°C bajo nitrógeno durante 18 h. Se combinaron las mezclas de reacción y se eliminaron los disolventes a vacío, se disolvió el residuo en MeOH al 10% en disolución de DCM (500 ml) y se lavó con disolución de acetato de amonio sat. (400 ml). Se extrajo la fase acuosa con MeOH al 10% adicional en disolución de DCM (2 x 400 ml). Se evaporaron los extractos orgánicos combinados a vacío y se adsorbió previamente el residuo sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyendo con 0-40% EtOAc en DCM, elución en gradiente) para dar el compuesto del título 1 como un sólido amarillo pálido (8,4 g, 9,89 mmol, 32,4%):  $R_t$  2,70 min,  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 1,37 (9H, s), 5,50 (2H, s), 5,78 (2H, s), 6,49 (1H, d), 6,91 (1H, t), 6,95 (1H, dt), 7,04 (1H, m), 7,15 (1H, t), 7,28 (1H, t), 7,54 (1H, d), 7,68-7,72 (2H, m solapante), 7,83 (1 H, dd), 8,15 (1 H, s). El material tenía aproximadamente una pureza del 80%.

2-((4-Amino-3-(3-(*tert*-butoxi)-5-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona; 1 (a partir de éster borónico, 2)



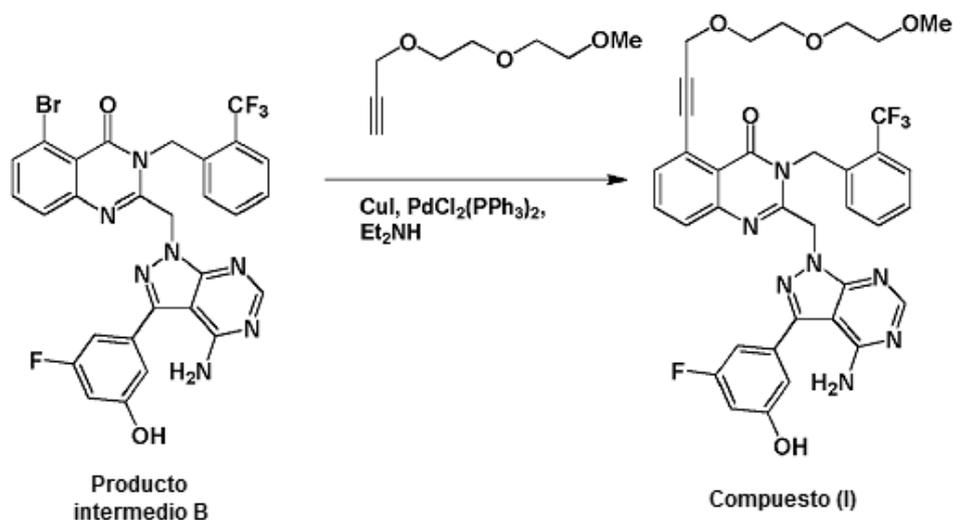
Una mezcla del producto intermedio A (10,0 g, 14,9 mmol; preparado tal como se describe en el ejemplo 1), 2-(3-(*tert*-butoxi)-5-fluorofenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano 2 (6,59 g, 22,40 mmol) (3,17 g, 14,9 mmol), carbonato de sodio decahidratado (26,75 g, 23,6 mmol) y *tetrakis*-trifenilfosfina de paladio (0,52 g, 0,45 mmol) en una mezcla de EtOH/agua (9:1, 500 ml) se desgasificó con nitrógeno, se sonicó durante 10 min y entonces se agitó a 65°C bajo nitrógeno durante 40 h. Se eliminaron los disolventes a vacío, se disolvió el residuo en MeOH al 10% en disolución de DCM (250 ml) y se lavó con disolución de acetato de amonio sat. (200 ml). Se extrajo la fase acuosa con MeOH al 10% adicional en disolución de DCM (2 x 200 ml). Se evaporaron los extractos orgánicos combinados a vacío y se adsorbió previamente el residuo sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (eluyendo con 0-40% EtOAc en DCM, elución en gradiente) para dar el compuesto del título como un sólido amarillo pálido (4,5 g, 6,14 mmol, 41,1%):  $R_t$  2,70 min.

2-((4-Amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona



5 A una disolución de de 2-((4-amino-3-(3-(*terc*-butoxi)-5-fluorofenil)-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il)metil)-5-bromo-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona 1 (13,0 g, 18,6 mmol) en DCM (150 ml) se le añadió ácido trifluoroacético (21,6 ml, 280 mmol) y se agitó la disolución resultante durante 2 h. Se eliminó el disolvente a vacío. El residuo se llevó a DCM (200 ml) y una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (200 ml). Se extrajo la fase acuosa  
10 adicionalmente con MeOH al 10% en DCM (2 x 100 ml) y se evaporaron los extractos orgánicos combinados a vacío. El residuo se absorbió previamente sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con 0-3% MeOH en DCM para dar el compuesto del título 1b como un sólido blanco (7,60 g, 11,8 mmol, 63,0%): m/z 640 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 5,47 (2H, s), 5,78 (2H, s), 6,43 (1H, d), 6,65 (1H, dt), 6,75 (1H, m), 6,79 (1H, t), 7,14 (1H, t), 7,28 (1H, t), 7,53 (1H, d), 7,69-7,73 (2H, m solapante), 7,85 (1H, m), 8,13 (1H, s), 10,18 (1H, d).

15 *Compuesto (I)*: 2-((4-Amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il)metil)-5-(3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-in-1-il)-3-(2-(trifluorometil)bencil)quinazolin-4(3H)-ona como polimorfo cristalino de forma 1



20 Se desgasificó con nitrógeno meticulosamente una mezcla de 3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-ino (4,69 g, 29,7 mmol), yoduro de cobre (I) (226 mg, 1,19 mmol), el producto intermedio B (7,6 g, 11,9 mmol) y dicloruro de *bis*(trifenilfosfina)paladio (II) (833 mg, 1,19 mmol) en dietilamina (330 ml) y se agitó a 60°C durante 3 h. Se añadió más 3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-ino (400 mg), dicloruro de *bis*(trifenilfosfina)paladio (II) (167 mg, 0,24 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,45 g, 0,24 mmol) se le añadió en dietilamina (30,0 ml) y se agitó a 60°C durante 3 h. Se añadió una alícuota adicional de 3-(2-(2-metoxietoxi)etoxi)prop-1-ino 7 (400 mg), dicloruro de *bis*(trifenilfosfina)paladio (II) (167 mg, 0,24 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,45 g, 0,24 mmol) y se agitó la mezcla de  
25 reacción a 60°C durante unas 7 h más. Se eliminó el disolvente a vacío, se disolvió el residuo en MeOH al 10% en disolución de DCM (200 ml) y se lavó con disolución de acetato de amonio acuoso (10% en peso, 300 ml). Se extrajo adicionalmente la fase acuosa con MeOH al 10% en disolución de DCM (2 x 200 ml). Se evaporó la fase orgánica combinada a vacío. Se suspensión el residuo en MeOH (30,0 ml) durante la noche y se filtró. El sólido residuo se adsorbió previamente sobre sílice y se purificó mediante cromatografía en columna, (SiO<sub>2</sub>, eluyendo con 0-5% MeOH en DCM, elución en gradiente) para dar el compuesto (I) como un sólido tostado en forma del polimorfo  
30

crystalino de forma 1 (4,73 g, 6,52 mmol, 55,0%): m/z 718 (M+H)<sup>+</sup> (ES<sup>+</sup>); <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 3,20 (3H, s), 3,35-3,39 (2H, m solapante), 3,43-3,50 (4H, m solapante), 3,60-3,64 (2H, m solapante), 4,38 (2H, s), 5,49 (2H, s), 5,77 (2H, s), 6,42 (1H, d), 6,65 (1H, dt), 6,74 (1H, dq), 6,79 (1H, t), 7,15 (1H, t), 7,28 (1H, t), 7,52 (1H, d), 7,65-7,72 (2H, m solapante), 7,83 (1H, m), 8,13 (1H, s), 10,19 (1H, s).

El análisis de XRPD de una muestra de este material se realizó usando método de XRPD 2 en los procedimientos generales. El material era cristalino tal como se muestra en el patrón de XRPD obtenido (Figura 3), pero también contenía algún material amorfo. Un análisis de DSC (usando el método de DSC 1 en los procedimientos generales) en una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 se muestra en la Figura 4 (gráfico inferior), en la que puede observarse que la muestra se sometió a varios eventos de calentamiento. Una endoterma ancha con un pico máximo de 102°C fue seguida por una exoterma con un pico máximo de 141°C, que fue seguida por una endoterma más afilada con un pico máximo de 174°C. Se observó que durante el calentamiento se formó un nuevo polimorfo cristalino - posteriormente se encontró que era el polimorfo cristalino de forma 2. El análisis TGA (usando el método de TGA 1 en los procedimientos generales) en una muestra del polimorfo cristalino de forma 1 (Figura 4; gráfico superior) mostró una pérdida de peso del 0,34% del ambiente a 75°C probablemente debido a la evaporación del disolvente libre y/o agua higroscópica.

### Ejemplo 3 - Preparación del compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 2

#### *Método 1*

El polimorfo cristalino de forma 2 puede prepararse cristalizando en una disolución en 1-propanol, tal como sigue. Se cargó un reactor de 100 ml con 1,98 g del compuesto (I) y 49,5 ml de 1-propanol (25 l/kg). Se agitó la mezcla y se calentó hasta 95°C (se observó una disolución a 92°C). Se mantuvo la disolución a 95°C durante 30 minutos antes de enfriarse hasta 23°C a lo largo de 10 horas, produciéndose cristalización espontánea a 72°C. Se agitó la mezcla heterogénea durante 4 horas, entonces el filtrado se filtró y se lavó con 1-propanol (2 ml). Se secó el producto a 45°C a vacío durante 18 horas para dar 1,71 g del polimorfo cristalino de forma 2 en un rendimiento del 86,4%.

#### *Método 2*

La cristalización del polimorfo cristalino de forma 2 en una disolución en 1-propanol también puede facilitarse sembrando con un cristal o cristales del polimorfo cristalino de forma 2, tal como sigue. Se añadió 1-propanol (25,00 l/kg, 275,0 ml) al compuesto (I) (11,00 g). Se agitó la mezcla a 350 rpm a 25°C. Entonces se calentó la mezcla heterogénea hasta 97°C a lo largo de 40 minutos (temperatura de reflujo), se mantuvo durante 5 minutos a 97°C, entonces se enfrió hasta 96°C a lo largo de 5 minutos, entonces se mantuvo durante 1 hora a 96°C. Se enfrió la disolución ligeramente naranja homogénea hasta 85°C a lo largo de 15 minutos. Entonces se redujo la velocidad de agitación hasta 250 rpm y se sembró la disolución con el polimorfo cristalino de forma 2 (0,01 kg de cristal de siembra/kg de material de partida de compuesto (I), 0,11 g). Se agitó la mezcla durante 10 minutos a 85°C, entonces se enfrió hasta 22°C a lo largo de 8 h, usando enfriamiento cúbico con un coeficiente no lineal de 2,3. Se agitó la mezcla heterogénea durante 10 horas a 22°C antes de filtrar el filtrado. El producto se lavó con 1-propanol (1,00 l/kg, 8,84 g, 11,00 ml), entonces se secó a 45°C (fin de semana; 72 horas) para dar el polimorfo cristalino de forma 2 (9,5 g, 86,4%).

#### *Método 3*

El polimorfo cristalino de forma 2 puede prepararse suspendiendo el polimorfo cristalino de forma 1 en metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, acetato de isopropilo, TBME, 2-butanona, DMSO, dietil éter, MIBK, heptano, nitrometano, agua al 10%/etanol, agua al 10%/acetonitrilo o agua al 10%/2-propanol.

#### *Método 4*

El polimorfo cristalino de forma 2 puede prepararse suspendiendo el compuesto (I) en forma amorfa en metanol, etanol, 2-propanol, 1-propanol, acetona, acetato de etilo, acetonitrilo, tolueno, acetato de isopropilo, TBME, 2-butanona, DMSO, dietil éter, MIBK, nitrometano, agua al 10%/etanol o agua al 10%/2-propanol.

#### *Método 5*

Una preparación ampliada a escala del polimorfo cristalino de forma 2 es tal como sigue: se pesaron 200 mg de polimorfo cristalino de forma 1 en un vial de centelleo a 20 ml. Se añadieron 50 volúmenes de metanol y se suspendió la muestra durante 24 horas entre 20°C y 50°C (4 horas a cada temperatura) con agitación constante a 500 rpm. El material resultante se filtró a vacío y se secó en el horno de vacío durante la noche a 40°C.

### Ejemplo 4 - Caracterización del compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 2

El análisis de XRPD de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 se realizó usando el método de XRPD 3 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD obtenido se muestra en la Figura 5.

5 El análisis TGA de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 se realizó usando el método de TGA 2 en los procedimientos generales. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 6 a partir de la que resulta evidente que el polimorfo cristalino de forma 2 mostró una pérdida de peso de  $\pm 0,5\%$  de desde  $155^{\circ}\text{C}$  hasta  $200^{\circ}\text{C}$ .

10 El análisis de DSC en una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 se realizó usando el método de DSC 2 en los procedimientos generales. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 7 a partir de la que resulta evidente que el polimorfo cristalino de forma 2 mostró fusión con descomposición a  $190,1^{\circ}\text{C}$  (máximo pico).

15 Un gráfico de isothermas de DVS de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 se muestra en la Figura 8 y un gráfico del cambio de masa de DVS se muestra en la Figura 9. Se observó que el polimorfo cristalino de forma 2 absorbió agua gradualmente  $\pm 0,4\%$  desde el 0% de HR hasta el 95% de HR y la captación de agua fue reversible, lo que indica que la forma 2 no es higroscópica.

20 Un estudio de estabilidad estática de una muestra del polimorfo cristalino de forma 2 demostró que la muestra era estable a la humedad con respecto a la forma sólida ya que no se observaron cambios mediante XRPD (usando el método de XRPD 3 en los procedimientos generales) tras el análisis de DVS (véase la Figura 10) y 1 semana de almacenamiento a  $25^{\circ}\text{C}/96\%$  de HR y  $40^{\circ}\text{C}/75\%$  de HR (véase la Figura 11, usando XRPD método 1 en los procedimientos generales).

Ejemplo 5 - Estabilidad del compuesto (I) micronizado como polimorfo cristalino de forma 2

25 Se preparó el polimorfo cristalino de forma 2 micronizado usando un dispositivo de micronización Jetmill de 5 cm para producir la siguiente distribución de tamaño de partícula:  $D_{10} = 1,14 \mu\text{m}$ ;  $D_{50} = 1,94 \mu\text{m}$  y  $D_{90} = 3,39 \mu\text{m}$  (la distribución de tamaño de partícula se determinó usando difracción láser (instrumento Malvern Mastersizer).

30 Se analizó el material micronizado mediante TGA, XRPD y DSC en el momento cero y después de diferentes condiciones de almacenamiento. Se almacenaron muestras en las siguientes condiciones: (i) 7 semanas a TA/<5% de HR; (ii) 7 semanas a TA/56% de HR; (iii) 7 semanas a TA/75% de HR; (iv) 7 semanas a  $50^{\circ}\text{C}$ ; y (v) 7 semanas a  $40^{\circ}\text{C}/75\%$  de HR.

35 Los datos mostrados en la tabla 3 indican que la muestra era cristalográfica y termodinámicamente estable ya que no se observaron cambios significativos en las diferentes condiciones.

Tabla 3: Datos de estabilidad para el polimorfo cristalino de forma 2 (micronizado)

Condiciones	TGA		XRD	IR	DSC		Apariencia
	<100	<185°C			Máx. (°C)	Adicional (°C)	
0 días	0,1	0,3	REF	REF	188,4	113,3(17 J/g)	blanco
TA/<5% de HR*	0,1	0,3	~Ref	~Ref	188,6	113,8(11 J/g)	blanco
TA/56% de HR*	0,1	0,4	~Ref	~Ref	188,5	113,7(8 J/g)	blanco
TA/75% de HR*	0,2	0,4	~Ref	~Ref	188,7	113,7(10 J/g)	blanco
50°C*	0,0	0,3	~Ref	~Ref	187,8	119,8 (3 J/g)	blanco
40°C/75% de HR*	0,1	0,2	~Ref	~Ref	188,5	117,4 (1 J/g)	blanco

\* durante 7 semanas; REF = referencia cristalina; ~Ref = idéntico a la referencia

40 Ejemplo 6 - Preparación del compuesto (I) en forma amorfa

45 El compuesto (I) en forma amorfa se preparó calentando el polimorfo cristalino de forma 1 (obtenido usando el procedimiento del ejemplo 2) hasta  $120^{\circ}\text{C}$ .

Ejemplo 7 - Preparación del compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 3

Método 1

50 El polimorfo cristalino de forma 3 puede prepararse suspendiendo el compuesto (I) en forma amorfa en diclorometano.

Método 2

55 Una preparación ampliada a escala del polimorfo cristalino de forma 3 es tal como sigue: 200 mg del polimorfo cristalino de forma 1 se le añadió a un vial de 4 ml que contiene 5 volúmenes de diclorometano. La muestra se agitó con vórtex durante 30 segundos. Entonces se añadieron 5 volúmenes adicionales de DCM y la muestra se agitó con

vórtex durante otros 30 segundos. La muestra se filtró a vacío y se secó en un horno de vacío a lo largo del transcurso de un fin de semana a 25°C.

#### Ejemplo 8 - Caracterización del compuesto (I) como polimorfo cristalino de forma 3

El análisis de XRPD de una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 se realizó usando el método de XRPD 2 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD se muestra en la Figura 12.

Los datos de TGA y DSC (usando el método de TGA 1 y el método de DSC 1 en los procedimientos generales) obtenidos en una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 se muestran en la Figura 13. El polimorfo cristalino de forma 3 se funde con descomposición a aproximadamente 186°C (máximo pico; DSC - gráfico inferior).

Una isoterma de GVS obtenida en una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 se muestra en la Figura 14, en la que se observó un cambio de masa del 0,99% desde el 0-90% de HR.

Un estudio de estabilidad estática de una muestra del polimorfo cristalino de forma 3 demostró que la muestra era estable a la humedad con respecto a la forma sólida ya que no se observaron cambios mediante XRPD (usando el método de XRPD 2 en los procedimientos generales) tras el análisis de GVS (véase la Figura 15) y tras 1 semana de almacenamiento a 25°C/96% de HR y 40°C/75% de HR (véase la Figura 16; usando XRPD método 1 en los procedimientos generales).

#### Ejemplo 9 - Preparación del compuesto (I) como pseudopolimorfo de forma 4

El compuesto (I) en forma del polimorfo cristalino de forma 1 (20 mg) o el compuesto (I) en forma amorfa (20 mg) se pesó en un vial de HPLC. Entonces se añadió THF en incrementos a temperatura ambiente con agitación durante 1 minuto. Entonces se agitó la muestra (500 rpm) a 50°C durante 15 minutos antes de la siguiente adición de THF. Se continuó con este proceso hasta que se habían añadido 80 volúmenes de THF para obtener una disolución. La disolución se enfrió desde 50°C hasta 5°C a 0,1°C/min y se mantuvo a 5°C durante la noche. Entonces se dejó que la disolución se evaporase con el fin de obtener un sólido. El sólido se filtró a vacío, se secó al aire (a vacío) durante 2 horas antes de analizarse mediante XRPD usando el método de XRPD 1 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD de una muestra del sólido obtenido usando el compuesto (I) en forma amorfa como material de partida se muestra en la Figura 17 y corresponde al pseudopolimorfo de forma 4. Una muestra del sólido obtenido usando el polimorfo cristalino de forma 1 como material de partida se secó en un horno de vacío a 25°C durante >48 horas antes de analizarse de nuevo mediante XRPD. Tras este periodo de secado prolongado, se observó que el polimorfo cristalino de forma 4 se había convertido en el compuesto (I) en forma amorfa. Como tal, el pseudopolimorfo de forma 4 es un solvato metaestable.

#### Ejemplo 10 - Preparación del compuesto (I) como pseudopolimorfo de forma 5

El compuesto (I) en forma del polimorfo cristalino de forma 1 (20 mg) o el compuesto (I) en forma amorfa (20 mg) se pesó en un vial de HPLC. Entonces se añadió 1,4-dioxano en incrementos a temperatura ambiente con agitación durante 1 minuto. Entonces se agitó la muestra (500 rpm) a 50°C durante 15 minutos antes de la siguiente adición de 1,4-dioxano. Se continuó con este proceso hasta que se habían añadido 80 volúmenes de 1,4-dioxano para obtener una disolución. Se enfrió la disolución desde 50°C hasta 5°C a 0,1°C/min y se mantuvo a 5°C durante la noche. Entonces se dejó que se evaporase la disolución con el fin de obtener un sólido. El sólido se filtró a vacío, se secó al aire (a vacío) durante 2 horas antes de analizarse mediante XRPD usando el método de XRPD 1 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD de una muestra del sólido obtenido usando el compuesto (I) en forma amorfa como material de partida se muestra en la Figura 17 y corresponde al pseudopolimorfo de forma 5. Una muestra del sólido obtenido usando el polimorfo cristalino de forma 1 como material de partida se secó en un horno de vacío a 25°C durante >48 horas antes de analizarse de nuevo mediante XRPD. Tras este periodo de secado prolongado, el pseudopolimorfo de forma 5 no había cambiado de forma. Se realizó una caracterización adicional para generar datos de <sup>1</sup>H-RMN, TGA y DSC (no mostrados) que mostraron que el pseudopolimorfo de forma 5 revirtió de vuelta al compuesto (I) en forma amorfa tras la pérdida de disolvente. Como tal, el pseudopolimorfo de forma 5 es un solvato metaestable.

#### Ejemplo 11 - Preparación del compuesto (I) como pseudopolimorfo de forma 6

El compuesto (I) en forma amorfa (20 mg) se pesó en un vial de HPLC. Entonces se añadió agua al 10%/acetronitrilo en incrementos a temperatura ambiente con agitación durante 1 minuto. Entonces se agitó la muestra (500 rpm) a 50°C durante 15 minutos antes de la siguiente adición de agua al 10%/acetronitrilo. Se continuó con este proceso hasta que se habían añadido 80 volúmenes de agua al 10%/acetronitrilo. Se dejó que la suspensión resultante madurase entre 25°C y 50°C (4 horas a cada temperatura) con agitación a 500 rpm durante 2 días. El sólido se filtró entonces a vacío, se secó al aire durante 2 horas y se analizó mediante XRPD usando el método de XRPD 1 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD de una muestra de este material se muestra en la Figura 17 y corresponde al pseudopolimorfo de forma 6. Tras el análisis de XRPD, el material se secó en un horno de vacío a 40°C durante la noche. Tras este periodo de secado prolongado, se observó que el pseudopolimorfo de forma 6

había perdido disolvente y se convirtió en el polimorfo cristalino de forma 2. Como tal, el pseudopolimorfo de forma 6 es un solvato metaestable.

#### Ejemplo 12 - Preparación del compuesto (I) como pseudopolimorfo de forma 7

5 El compuesto (I) en forma amorfa (20 mg) se pesó en un vial de HPLC. Entonces se añadió agua al 10%/acetona en incrementos a temperatura ambiente con agitación durante 1 minuto. Entonces se agitó la muestra (500 rpm) a 50°C durante 15 minutos antes de la siguiente adición de agua al 10%/acetona. Se continuó con este proceso hasta que se habían añadido 80 volúmenes de agua al 10%/acetona. Se dejó que la suspensión resultante madurase entre 10 25°C y 50°C (4 horas a cada temperatura) con agitación a 500 rpm durante 2 días. El sólido se filtró entonces a vacío, se secó al aire durante 2 horas y se analizó mediante XRPD usando el método de XRPD 1 en los procedimientos generales. El patrón de XRPD de una muestra de este material se muestra en la Figura 17 y corresponde al pseudopolimorfo de forma 7. Tras el análisis de XRPD el material se secó en un horno de vacío a 15 40°C durante la noche. Tras este periodo de secado prolongado, se observó que el pseudopolimorfo de forma 7 había perdido disolvente y se había convertido en el polimorfo cristalino de forma 2. Como tal, el pseudopolimorfo de forma 7 es un solvato metaestable.

#### Ejemplo 13 - Estabilidad termodinámica de los polimorfos cristalinos de forma 2 y forma 3 y su interconversión

20 Se realizaron experimentos de suspensión competitiva en mezclas 50:50 de los polimorfos cristalinos de forma 2 y forma 3. Se añadieron 50 volúmenes de disolvente y se agitaron las muestras (300 rpm) a una temperatura fija durante 3 días. Todas las muestras se filtraron entonces a vacío y se secaron al aire durante 30 minutos antes del análisis de XRPD.

25 Los resultados de los experimentos de suspensión se resumen en la tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Resultados de suspensión competitiva

Disolvente	Temperatura	Observación	Resultados de XRPD
Cloroformo	50°C	disolución transparente y sólido	forma 2
Cloroformo	25°C	suspensión	forma 2
Cloroformo	5°C	suspensión	forma 2
Acetonitrilo	50°C	disolución transparente y sólido	forma 2
Acetonitrilo	25°C	suspensión	forma 2
Acetonitrilo	5°C	suspensión	forma 2
Agua al 10%/ACN	50°C	disolución transparente y sólido	forma 2
Agua al 10%/ACN	25°C	suspensión	forma 2
Agua al 10%/ACN	5°C	suspensión	forma 2
Etanol	25°C	suspensión	forma 2
Etanol	40°C	suspensión	forma 2
Etanol	60°C	disolución transparente y sólido	forma 2
Acetona	25°C	suspensión	forma 2
Acetona	40°C	suspensión	forma 2
Acetona	60°C	disolución transparente y sólido	forma 2
Acetato de etilo	25°C	suspensión	forma 2
Acetato de etilo	40°C	suspensión	forma 2
Acetato de etilo	60°C	disolución transparente y sólido	forma 2

30 Todos los experimentos de suspensión competitiva dieron como resultado la forma 2, lo que indica que ésta es la forma termodinámicamente más estable.

#### Ejemplo 14 – Metodología de examen *in vitro* e *in vivo* y resultados

##### *Examen in vitro*

35 *Pruebas biológicas: métodos experimentales*

##### *Ensayo de inhibición enzimática*

40 Las enzimas PI3K catalizan la fosforilación de 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>) a 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol (PIP<sub>3</sub>) en presencia de ATP e iones Mg<sup>2+</sup>. El producto de PIP<sub>3</sub> pueden detectarse mediante el desplazamiento de biotina-PIP<sub>3</sub> a partir de complejos de transferencia de energía que consisten en anticuerpo monoclonal anti-GST marcado con europio, un dominio de homología Pleckstrin (PH) etiquetado con GST, PIP<sub>3</sub> biotinilado y estreptavidina-alofoiocianina (APC) mediante la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET) (ensayo enzimático HTRF@PI3K, Millipore). La excitación, a 330 nm, de europio en el complejo da como resultado una transferencia de energía a la APC y una emisión fluorescente a 45

665 nm aunque el propio europio emita a su longitud de onda característica de 620 nm. El producto de PIP3 formado mediante la actividad PI3K desplaza la biotina-PIP3 del complejo y da como resultado una pérdida de transferencia de energía (señal decreciente).

5 Se añadió el compuesto que debe someterse a prueba, a las concentraciones finales deseadas, a una mezcla de sustrato de PIP2 y una enzima PI3K recombinante (ya sean las isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\delta$ , de Millipore, o la isoforma  $\gamma$  [constructo p110 $\gamma$  + p101], de United States Biological, Swampscott, MA) y la mezcla se incubó durante 2 h a TA. Tras este periodo de incubación, se añadió ATP (10  $\mu$ M) a la mezcla de enzima/compuesto/sustrato de PIP2 y se  
10 incubó la mezcla resultante durante 30 min más a TA. Entonces se añadieron una disolución de parada que contiene PIP3 biotinilado y la mezcla de detección que contiene el dominio de homología pleckstrin (PH) GRP1 etiquetada con GST y fluoróforos, y se incubó la mezcla a TA durante 15-18 h, antes de la detección en un lector de microplacas de fluorescencia (Synergy 4, BioTek UK, Bedfordshire, Reino Unido).

15 Los resultados se calcularon según la fórmula: señal de APC (emisión a 665 nm)/señal de europio (emisión a 620 nm)  $\times 10^4$ . Se calculó la inhibición en porcentaje de cada reacción en relación con el control tratado con DMSO, y entonces se calculó la concentración inhibidora al 50% (valor de  $CI_{50}$ ) a partir de la curva de concentración-respuesta.

#### 20 *Ensayo basado en células PI3K $\delta$*

Como medio de evaluación de la activación de PI3K  $\delta$  en respuesta a estímulos, se determinó el estado de fosforilación de la proteína, Akt, un producto posterior de la señalización de PI3K $\delta$ .

25 Se diferenciaron células U937, obtenidas de una línea celular de linfoma monocítico, leucémica, humana, en células de tipo macrófago mediante incubación con PMA (100 ng/ml) durante de 48 a 72 h. Entonces se incubaron previamente las células con o bien el compuesto de prueba o bien el vehículo durante 2 h y entonces se estimularon brevemente mediante exposición a  $H_2O_2$  (10 mM, 5-7 min) y se detuvo la reacción reemplazando los medios con disolución de formaldehído al 4%. Se inactivaron la actividad de peróxido endógena y el formaldehído incubando con  
30 tampón de extinción (azida de sodio al 0,1%, 1% de  $H_2O_2$  en PBS con Triton X-100 al 0,1%) durante 20 min. Se lavaron las células con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron con disolución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 1 h y entonces se volvieron a lavar con tampón y se incubaron durante la noche o bien con anticuerpo anti-pAkt o bien con anticuerpo anti-pan-Akt (ambos de Cell Signaling Technology). Tras lavar con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%), se incubaron células con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Dako) y la señal resultante se determinó colorimétricamente (DO: 450 nm con una longitud de onda de  
35 referencia de 655 nm) usando sustrato TMB (paquete de reactivos de sustrato suministrado por R&D Systems, Inc.).

Esta reacción se detuvo mediante la adición de disolución de  $H_2SO_4$  (100  $\mu$ l). Entonces se lavaron las células con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) y se aplicó disolución de violeta cristal al 5% (100  $\mu$ l) durante  
40 30 min. Tras lavar con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) se añadió SDS al 1% (100  $\mu$ l) a cada pocillo y se agitaron ligeramente las placas durante 1 h antes de medir la absorbancia a 595 nm (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific). Se corrigieron las lecturas de  $DO_{450-655}$  medidas para el número de células dividiendo la  $DO_{450-655}$  entre las lecturas de  $DO_{595}$ . La relación de señal de pAkt con respecto a señal de Akt total se usó para cuantificar el grado de activación de PI3K  $\delta$ . Se calculó la inhibición en porcentaje para cada pocillo en relación con un control convencional de 10  $\mu$ g/ml (LY294002) fijado a una inhibición del 100% frente a controles sólo de  $H_2O_2$   
45 como unan inhibición del 0%. Se calcularon los valores de  $CI_{50}$  a partir de las curvas de concentración-respuesta generadas mediante las diluciones en serie de los compuestos de prueba.

#### *Ensayo basado en células PI3K $\gamma$*

50 Como medio de evaluación de la activación de PI3K  $\gamma$  en respuesta a estímulos, se determinó el estado de fosforilación de la proteína, Akt, un producto posterior de la señalización de PI3K  $\gamma$ , tras estimulación con MCP-1.

Se diferenciaron células U937 en células de tipo macrófago mediante incubación con PMA (100 ng/ml) durante de  
55 48 a 72 h. Entonces se incubaron previamente las células o bien con el compuesto de prueba o bien con el vehículo durante 2 h y entonces se estimularon brevemente con MCP-1 (10 nM, 1 min) y se detuvo la reacción reemplazando los medios con disolución de formaldehído al 4%. Se inactivaron las actividad peróxido endógena y el formaldehído incubando con tampón de extinción (azida de sodio al 0,1%, 1% de  $H_2O_2$  en PBS con Triton X-100 al 0,1%) durante 20 min. Se lavaron las células con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) y se incubaron con disolución de bloqueo (BSA al 1% en PBS) durante 1 h y entonces se volvieron a lavar con tampón y se incubaron durante la  
60 noche o bien con anticuerpo anti-pAkt o bien con anticuerpo anti-pan-Akt (ambos de Cell Signaling Technology). Tras lavar con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%), se incubaron las células con un anticuerpo secundario conjugado con HRP (Dako) y la señal resultante se determinó colorimétricamente (DO: 450 nm con una longitud de onda de referencia de 655 nm) usando sustrato de TMB (paquete de reactivos de sustrato suministrado por R&D Systems, Inc.).  
65

Se detuvo esta reacción mediante la adición de disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N (100 µl). Entonces se lavaron las células con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) y se aplicó disolución de violeta cristal al 5% (100 µl) durante 30 min. Tras lavar con tampón (PBS que contenía Triton X-100 al 0,1%) se añadió SDS al 1% (100 µl) a cada pocillo y se agitaron ligeramente las placas durante 1 h antes de medir la absorbancia a 595 nm (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific). Se corrigieron las lecturas de DO<sub>450-655</sub> medidas para el número de células dividiendo la DO<sub>450-655</sub> entre las lecturas de DO<sub>595</sub>. La relación de señal de pAkt con respecto a la señal Akt total se usó para cuantificar el grado de activación de PI3K γ. Se calculó la inhibición en porcentaje para cada pocillo en relación con un control convencional de 10 µg/ml (LY294002) fijado a una inhibición del 100% frente a controles sólo de MCP-1 como una inhibición del 0%. Se calcularon los valores de CI<sub>50</sub> a partir de las curvas de concentración-respuesta generadas mediante las diluciones en serie de los compuestos de prueba usando XL-Fit (idbs, Guildford, Reino Unido).

#### *Ensayo de producción de aniones superóxido*

Como medio de evaluación de la función celular dependiente de PI3Kδ, se evaluó la producción de aniones superóxido en células U937 cebadas con IFNγ, mediante un ensayo de quimioluminiscencia. Se mantuvieron las células U937 (adquiridas de ATCC, Manassas, VA) en RPMI 1640 (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) con FCS al 10% a 37°C. Se suspendieron las células a una densidad de 10<sup>7</sup> células/ml en 40 ml de FCS RPMI 1640 al 10%, y se trataron con 20 µl de disolución de IFNγ 100 µg/ml (concentración final: 50 ng/ml), y se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 4 días.

Se sembraron células U937 cebadas con IFNγ, a 0,2 x 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 96 pocillos, y se incubaron previamente con compuestos de prueba durante 2 h en medios de privación de nutrientes (FCS RPMI1640 al 0,5% libre de rojo fenol). Se resuspendió Zymosan A (10 mg) de *Saccharomyces cerevisiae* (de Sigma-Aldrich) en 1 ml de NaCl 150 mM y se sometió a ebullición a 100°C durante 15 min. Tras la ebullición, las partículas de Zymosan se lavaron con 1 ml de PBS dos veces, y se incubaron con 0,5 ml de reactivos opsonizados BioParticles™ (Life technologies) durante 60 min a 37°C. Se trataron las células con una mezcla de disolución de partículas Zymosan (10 µl), tampón de ensayo (85 µl), luminol (2,5 µl) y disolución potenciadora (2,5 µl), que se proporcionan todos (excepto el Zymosan) en el kit de ensayo de aniones superóxido (n.º CS1000, Sigma-Aldrich Ltd, Poole, Reino Unido). Se midió la quimioluminiscencia que indica anión superóxido liberado cada 15 min hasta 60 min mediante la medición luminométrica (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific).

Los datos 60 min tras la incubación se usaron para el análisis. Se calculó la inhibición en porcentaje para cada pocillo en relación con IC87114 10 µg/ml, un inhibidor de PI3Kδ convencional, fijado a una inhibición del 100% frente al control como una inhibición al 0%. Los valores de CE<sub>50</sub> relativos se calcularon a partir de las curvas de concentración-respuesta generadas mediante las diluciones en serie de los compuestos de prueba usando XL-Fit (idbs, Guildford, Reino Unido).

#### *Producción de citocinas inducida por CytoStim en PBMC*

Como medio de evaluación de la función celular dependiente de PI3Kδ, se evaluaron las IL-4, IL-5, IL-13 inducidas por CytoStim y la producción de IFNγ en PBMC mediante un ensayo de múltiple Luminex. Todos los voluntarios sanos se reclutaron por Quintiles Limited (London, Reino Unido), y se suministraron muestras sanguíneas a Respivert Ltd. Este estudio fue aprobado por el Comité de ética local, y todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito.

Se añadieron suspensiones de PBMC (200 µl; 2 x 10<sup>6</sup> células/ml) a una placa de 96 pocillos. Se trataron las células o bien con compuestos de prueba en DMSO puro o bien con DMSO como vehículo (2 µl) y se incubaron a TA durante 1 h. Se introdujo CytoStim (Miltentyi Biotec, Surrey, Reino Unido) a una razón de 1:50 y se incubaron las células durante 20 h (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Se hicieron rotar las placas a 500 x g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Se usó un kit de perla magnética de citocina con alta sensibilidad (#HSCYTMAG-60SK, Millipore, Watford, Reino Unido) para medir los cuatro analitos (IL-4, IL-5, IL-13 y IFNγ) de Luminex tal como sigue: se multiplexaron las células de anticuerpo magnéticos y se incubaron en una placa de 96 pocillos con medio, convencional sólo o una muestra (50 µl) durante la noche con agitación a 4°C. Tras lavar dos veces con tampón de lavado Millipore proporcionado en el kit usando un lavador de placa magnética, las perlas se incubaron durante 1 h con anticuerpo de detección (50 µl) con agitación a TA. Una disolución de estreptavidina/ficoeritrina proporcionada en el kit se le añadió durante 30 min con agitación a TA. Tras el lavado, las perlas se volvieron a suspender en fluido de recubrimiento (150 µl) y se analizaron inmediatamente. El sistema Luminex se fijó a un recuento de 50 perlas y la cantidad de cada analito en el sobrenadante se calculó con respecto a una curva convencional. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron a partir de curvas de concentración-inhibición usando XL-Fit (IDBS, Guildford, Reino Unido)

#### *Quimiotaxis con respecto a MCP1*

Como medio de evaluación de la función celular dependiente de PI3K γ, se evaluó la quimiotaxis de células THP1 en relación con MCP-1 usando una cámara de quimiotaxis de 48 pocillos. Se mantuvieron las células THP1 de una

línea celular de linfocitos de monocitos leucémica humana (adquirida de ATCC Manassas, VA) en RPMI 1640 (Invitrogen Ltd., Paisley, Reino Unido) con FCS al 10% a 37°C. Las células volvieron a suspenderse en BSA al 0,5% /RPMI1640 ( $2 \times 10^6$  células/ml) y se incubaron durante 10 min a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5%. Entonces se trataron alícuotas de suspensiones celulares (500 µl) o bien con compuestos en DMSO puro o bien con DMSO como vehículo (2,5 µl) durante 1 h (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%).

Se preparó MCP1 (50 nM) en BSA al 0,5%/RPMI1640. Se añadió disolución de MCP1 (50 µl) a cada pocillo en la placa inferior de una cámara de quimiotaxis de 48 pocillos (AP48, NeuroProbe Inc., Gaithersburg, MD). Se montó una membrana de policarbonato (8 µm) en la cámara inferior, y entonces se montó la placa superior sobre la cámara inferior y la membrana de filtro. Se trataron alícuotas de suspensión celular (50 µl) con compuestos o vehículo antes de añadirse a la cámara superior cuidadosamente, y se aplicó BSA al 0,5% RPMI1640 (50 µl) en la parte superior. Entonces se dejó la cámara durante 2 h (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). Entonces se retiró cuidadosamente la membrana y se transfirió la muestra (25 µl) de la cámara inferior a una nueva placa de 96 pocillos.

Se añadió una disolución de MTT (50 µl) en FCS al 10% RPMI1640 libre de rojo fenol a cada pocillo, y se incubó la placa durante 2 h (37°C, CO<sub>2</sub> al 5%). Se añadió DMSO puro (100 µl) a cada pocillo para extraer el formazán formado a partir de MTT y las placas se agitaron ligeramente durante 1 h antes de medir la absorbancia a 595 nm (Varioskan® Flash, Thermo-Fisher Scientific). Se compararon los valores con la inhibición mediante AS604850 (10 µg/ml), un inhibidor de PI3Kγ selectivo, para calcular las inhibiciones en porcentaje relativas. Los valores de CE<sub>50</sub> relativos se determinaron a partir de las curvas de concentración-inhibición usando XL-Fit (idbs, Guildford, Reino Unido).

#### *Liberación de CXCL8 a partir de neutrófilos obtenidos de pacientes con COPD*

Se evaluaron mediante un ensayo ELISA los efectos de tratamiento sobre la liberación de CXCL8 a partir de los neutrófilos obtenidos de pacientes con COPD. Todos los pacientes fueron reclutados por Quintiles Limited (Londres, Reino Unido), y se suministraron las muestras de sangre a Respivert Ltd. Este estudio se aprobó por el Comité Ético local, y todos los sujetos dieron un consentimiento informado escrito. Se mezcló suavemente sangre completa (30 ml) con ACD (5 ml; que comprende: 7,36 g de ácido cítrico, 14,71 g de citrato de sodio, 9,91 g de dextrosa en 250 ml de agua estéril, de doble destilación) y dextrano al 6% (15 ml; diluidos en NaCl al 0,9%) para eliminar los glóbulos rojos. Los tubos se incubaron a TA durante 45 min, y el sobrenadante (fracción rica en glóbulos blancos) se recogió entonces, dejando los glóbulos rojos.

Esta fracción se centrifugó (10 min a 1200 rpm, 4°C) con bajo frenado. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en H<sub>2</sub>O destilada dos veces, estéril, helada (10 ml), y se añadió KCl 0,6 M (4 ml) 30 segundos más tarde. Se diluyó la suspensión celular con PBS estéril (hasta un volumen final de 50 ml) y entonces se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Se aspiró el sobrenadante y volvió a suspenderse el sedimento en PBS (2,5 ml), y dos tubos del mismo donador se combinaron en uno.

Esta suspensión celular se depositó cuidadosamente encima de 5 ml de Ficoll-paque™ premium (GE Healthcare Bio Science AB, Uppsala, Suecia) usando una pipeta Pasteur, y entonces se centrifugó (30 min a 1500 rpm con frenado bajo). Los neutrófilos aislados en el fondo de los tubos se resuspendieron en medio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido) que contenía FCS al 5% y se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se incubaron durante 30 min (37°C; CO<sub>2</sub> al 5%) antes de iniciar el tratamiento.

Se incubaron previamente los neutrófilos con compuestos de prueba o con vehículo de DMSO durante 1 h y entonces se estimularon con TNFα (10 ng/ml). Se recogió sobrenadante libre de células 3 h tras la estimulación de TNFα, y se midió CXCL8 mediante ELISA usando el kit de desarrollo DuoSet ELISA (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). Se determinaron los valores de CI<sub>50</sub> notificados a partir de curvas de concentración-inhibición usando XL-Fit (IDBS, Guildford, Reino Unido).

#### *Ensayo de MTT*

Se incubaron previamente células U937 diferenciadas con PMA con el compuesto de prueba (10 µg/ml) o vehículo durante 4 h en FCS al 5% o FCS al 10% durante 24 h. El sobrenadante se reemplazó con nuevo medio (200 µl) y se añadió disolución madre de MTT (10 µl, 5 mg/ml) a cada pocillo. Tras 1 h de incubación, se retiraron los medios, se añadieron 200 µl de DMSO a cada pocillo y las placas se agitaron ligeramente durante 1 h antes de leer la absorbancia a 550 nm. Se calculó el porcentaje de pérdida de viabilidad celular para cada pocillo en relación con el tratamiento con vehículo (DMSO al 0,5%).

#### *Examen in vivo: farmacodinámica y actividad antiinflamatoria*

##### *Acumulación de neutrófilos en las vías aéreas inducida por LPS en ratones*

A ratones BALB/c no sometidos a ayuno (6-8 semanas de edad) se les dosificó vehículo o compuesto de prueba mediante administración intratraqueal (volumen de dosis 20  $\mu$ l) en los puntos de tiempo T = -2 h, -8 h o -12 h con respecto al inicio de tratamiento con LPS. El LPS se preparó en una disolución de 0,5 mg/ml y se aerosolizó usando un nebulizador ultrasónica 2000 De Vibliiss (7 ml durante 30 min de exposición). Ocho h tras la exposición de LPS, se canuló la tráquea y se extrajo fluido de lavado broncoalveolar (BALF) extraído infundiendo y entonces retirando PBS (1 ml) en los pulmones a través del catéter traqueal. Este procedimiento se repitió para dar un rendimiento de aproximadamente 2 ml de fluido de lavado. Se midió el número de células totales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro. Se prepararon frotis de Cytospin de las muestras de BALF mediante centrifugación a 1200 rpm durante 2 min a TA y se tiñeron usando un sistema de tinción DiffQuik (Dade Behring) para recuentos de células diferenciales. Se contaron las células usando microscopía de inmersión en aceite. Los datos se expresan como número de neutrófilos de células por ml de BALF (media  $\pm$  E.E.M.).

#### *Acumulación de neutrófilos en las vías respiratorias inducida por LPS en ratas*

A ratas no sometidas a ayuno se les dosificó o bien el vehículo o bien el compuesto de prueba mediante administración intratraqueal (volumen de dosis 100  $\mu$ l) en los puntos de tiempo T = -2 h, -8 h o -12 h con respecto al inicio de tratamiento con LPS. La disolución de LPS (0,3 mg/ml) se aerosolizó usando un nebulizador ultrasónico 2000 De Vibliiss (7 ml durante 30 min). Ocho h tras la exposición a LPS, se canuló la tráquea y se extrajo fluido de lavado broncoalveolar (BALF) infundiendo y entonces retirando PBS (1 ml) en los pulmones a través del catéter traqueal. Este procedimiento se repitió para proporcionar aproximadamente 2 ml de fluido de lavado.

Se midieron los números de células totales en las muestras de BALF usando un contador de células automatizadas Countess (Invitrogen). Se prepararon frotis de Cytospin de las muestras de BALF mediante centrifugación a 1200 rpm durante 2 min a TA y se tiñeron usando un sistema de tinción DiffQuik (Dade Behring) para recuentos de células diferenciales. Se contaron las células usando microscopía de inmersión en aceite. Los datos se expresan como número de neutrófilos de células por ml de BALF (media  $\pm$  E.E.M.).

#### *Acumulación de eosinófilos y neutrófilos en las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en ratones*

Se inmunizaron ratones BALB/c (6-8 semanas de edad) con OVA (10  $\mu$ g/ratón i.p.) los días 0 y 7. Con el fin de provocar una respuesta inflamatoria local en el pulmón, los ratones se expusieron repetidamente entre los días 13-15 con una disolución nebulizada de ovoalbúmina (10 mg/ml, 30 min de exposición, De Vilibiss Ultraneb 2000). El día 17 cada animal recibió una administración por vía intratraqueal o bien de vehículo o bien de compuesto de prueba 2 h antes de la exposición a OVA final. Se anestesiaron los animales 8 h más tarde, antes de someterse a traqueotomía. Se obtuvo BAL instilando PBS (1 ml) en los pulmones, que entonces se retiró. Este procedimiento se repitió para proporcionar aproximadamente 2 ml de fluido de lavado. Se midieron los números de células totales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro. Se prepararon frotis de Cytospin de las muestras de BALF mediante centrifugación a 200 rpm durante 5 min a TA y se tiñeron usando un sistema de tinción DiffQuik (Dade Behring) para recuentos de células diferenciales. Se contaron las células usando microscopía de inmersión en aceite. Los datos se expresan como número diferencial de células por ml de fluido de lavado nasal (media  $\pm$  E.E.M.).

#### *Acumulación de células inducida por poli-I:C en ratones*

A ratones A/J libres de patógenos específicos (machos, 5 semanas de edad) se les dosificó poli (I:C)-LMW (1 mg/ml, 40  $\mu$ l) (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.) por vía intranasal dos veces al día durante 3 días bajo anestesia (isoflurano al 3%). Las sustancias de prueba se dosificaron por vía intranasal (50  $\mu$ l en DMSO al 10%/vehículo salino isotónico) 2 h antes de cada tratamiento con poli-I:C. 24 h tras la última exposición a poli-I:C, se anestesiaron los animales, se canuló la tráquea y se obtuvo lavado alveolar bronquial (BAL) instilando en y entonces retirando de los pulmones, solución salina isotónica (100 ml/kg). Se midieron los números de células totales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro bajo un microscopio de contraste de fase.

Se determinaron las proporciones de macrófagos y neutrófilos alveolares mediante análisis de FACS usando anticuerpo anti-ratón MOMA2-FITC (macrófago) o anticuerpo anti-ratón 7/4-FITC (neutrófilo). Se suspendieron células en PBS y se incubaron con anticuerpo anti-MOMA2-FITC (2  $\mu$ g/ml, n.º de catálogo SM065F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Alemania) o anticuerpo anti-7/4-FITC (2  $\mu$ g/ml, n.º de catálogo CL050F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Alemania) durante 30 min a 30°C, y entonces se contratiñeron con yoduro de propidio (2  $\mu$ g/ml) para permitir la exclusión de células necróticas. Las células se lavaron con PBS y se transfirieron a tubos de FACS. Se establecieron las muestras en un citómetro de flujo (ALTRA II; Beckman Coulter Japan, Tokyo, Japón), y se dibujó un histograma de un único parámetro FL2 [PMT2] (FITC) con eje de las x logarítmico para ilustrar la intensidad relativa de FITC. Se almacenaron los archivos de datos para un análisis posterior usando el software de análisis Kaluza (ver. 1.2) para calcular la proporción de cada tipo de célula.

#### *Modelo de humo de cigarrillos*

Se expusieron ratones A/J (machos, 5 semanas de edad) a humo de cigarrillos (humo de cigarrillos al 4%, diluido con aire comprimido) durante 30 min/día durante 11 días usando un sistema de experimento de inhalación de humo de tabaco para animales pequeños (modelo SIS-CS; Sibata Scientific Technology, Tokyo, Japan). Se administraron las sustancias de prueba una vez al día durante 3 días tras la exposición final al humo de cigarrillos (dosis intranasal que comprende 35  $\mu$ l de disolución en DMSO al 50%/solución salina isotónica).

12 h tras la administración de la última dosis, se anestesiaron los animales, se canuló la tráquea y se llevó a cabo un lavado alveolar bronquial (BAL) mediante la instilación en y entonces la retirada de los pulmones, de PBS (100 ml/kg). Se midieron los números de células totales en las muestras de BALF usando un hemocitómetro bajo un microscopio de contraste de fase. Las proporciones de macrófagos y neutrófilos alveolares mediante análisis de FACS usando anticuerpo anti-ratón MOMA2-FITC (macrófago) o anticuerpo anti-ratón 7/4 (neutrófilo).

Se suspendieron las células en PBS y se incubaron con anticuerpo anti-MOMA2-FITC (2  $\mu$ g/ml, n.º de catálogo SM065F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Alemania) o anticuerpo anti-7/4-FITC (2  $\mu$ g/ml, n.º de catálogo CL050F, Acris Antibodies GmbH, Herford, Alemania) durante 30 min a 30°C, y también se contratiñó con yoduro de propidio (2  $\mu$ g/ml) para permitir la exclusión de células necróticas. Las células se lavaron con PBS, y se transfirieron a tubos de FACS. Se establecieron las muestras en un citómetro de flujo (ALTRA II; Beckman Coulter Japan, Tokyo, Japón), y se dibujó un histograma de un único parámetro FL2 [PMT2] (FITC) con eje de la x logarítmico para ilustrar la intensidad relativa de FITC.

Se almacenan los archivos de datos para un análisis posterior usando el software de análisis Kaluza (ver. 1.2) para calcular la proporción de cada tipo de célula. Los niveles de CXCL1(KC), MCP1, TNF $\alpha$ , IL-17 u osteopontina en BALF se determinaron usando el kit de ELISA Quentikine® ratón KC, MCP1, TNF $\alpha$ , IL-17 u osteopontina (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.). La presencia de malondialdehído se midió usando el kit de ensayo OxiSelect® TBARS (cuantificación de MDA; Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, EE.UU.).

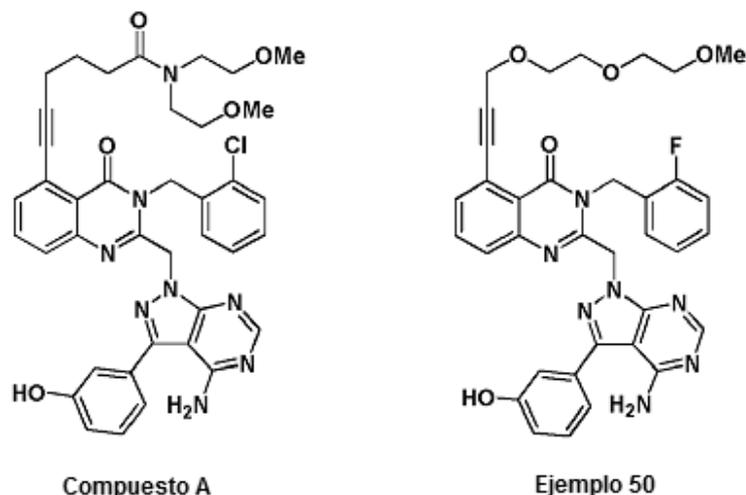
#### Sumario de resultados de examen *in vitro* e *in vivo*

El perfil *in vitro* del compuesto de fórmula (I), tal como se determina usando los métodos descritos anteriormente se presenta a continuación (tablas 5, 6 y 7). El compuesto de la presente invención demuestra una inhibición potente de ambas isoformas PI3K  $\delta$  y  $\gamma$ , y no muestra actividad inhibitora frente a PI3K  $\alpha$  y una actividad inhibitora baja de PI3K  $\beta$  frente a ensayos enzimáticos (tabla 5).

Estos efectos se traducen en una inhibición potente de la fosforilación de Akt inducida por la estimulación de células o bien con hidrógeno peróxido o bien con MCP-1. No se detectaron efectos sobre la viabilidad celular, que resultante de la incubación con el compuesto de fórmula (I) (Tabla 6). Además, se encontró que el tratamiento de células con el compuesto de fórmula (I) dado a conocer en el presente documento inhibía la producción de ROS a partir de células U937 y de citocinas a partir de PBMC expuestas a Cytostim (tabla 7).

Resulta destacable que el producto metabólico probable del compuesto de fórmula (I), que se corresponde concretamente con alcohol, el compuesto (Ia), es un inhibidor significativamente menos activo de las isoformas tanto PI3K  $\delta$  como  $\gamma$  que el compuesto de fórmula (I) (tabla 6). Por consiguiente, el compuesto de fórmula (Ia), es un inhibidor significativamente menos activo de producción ROS a partir de células U937 y de citocinas a partir de PBMC expuestas a Cytostim (tabla 7) que el compuesto de fórmula (I).

Tabla 5: Comparación de las actividades inhibitoras de la isoforma PI3K de compuestos de la técnica anterior con el compuesto (I).



Compuestos de prueba	Valores de $CI_{50}$ para la inhibición de PI3K en la isoforma indicada (nM)			
	PI3K $\alpha$	PI3K $\beta$	PI3K $\delta$	PI3K $\gamma$
Compuesto (I)	>13900	4890	2,5	28
Compuesto A <sup>1</sup>	193	NT	12	25
Ejemplo 50 <sup>2</sup>	653	NT	5,7	120

1) Compuesto de la técnica anterior dado a conocer en el documento WO 2012/052753; 2) Compuesto de la técnica anterior dado a conocer en el documento WO 2011/048111; NT no sometido a prueba;

- 5 Tabla 6: La actividad inhibidora de los compuestos (I) y (Ia) sobre las isoformas de la enzima PI3K; la inhibición de fosfilación inducida de Akt en células y sobre la viabilidad celular.

Comp. de prueba	Inhibición de PI3-cinasa				Actividad celular		Viabilidad celular	
	Valor de $CI_{50}$ en la isoforma de estado (nM)				Valores de $REC_{50}^a$ en células d-U937 (nM)		Ensayo de $MTT^b$ en células d-U937	
	$\delta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	Estímulo de $H_2O_2$	Estímulo de MCP-1	a 4 h	a 24 h
(I)	2,5	28	>13900	4890	7,4	16,5	-ve	-ve
(Ia)	17	577	>14200	>14200	ND	ND	-ve	-ve

a) para la inhibición de la fosforilación de Akt inducida; b) -ve indica un valor de <30% de inhibición a 10  $\mu$ g/ml; ND: no realizado

- 10 Tabla 7: Los efectos de los compuestos de fórmula (I) y (Ia) sobre la producción de ROS a partir de células U937 y la liberación de citocina a partir de PBMC

Sistema celular	Valor de $REC_{50}^1$ o de $CI_{50}^2$ (nM)	
	Compuesto (I)	Compuesto (Ia)
Producción de ROS <sup>a</sup> inducida por Zymosan en células U937 cebadas con IFN $\gamma^1$	11,8	143
IL-4 inducida por Cytostim en PBMC <sup>2</sup>	<1,4	674
IL-5 inducida por Cytostim en PBMC <sup>2</sup>	<1,4	14,5
IL-13 inducida por Cytostim en PBMC <sup>2</sup>	<1,4	6,1
IFN $\gamma$ inducida por Cytostim en PBMC <sup>2</sup>	13,8	60,8
Quimiotaxis de células THP1 a MCP1 <sup>1</sup>	33,9	>14200
CXCL8 inducida por TNF $\alpha$ en neutrófilos de pacientes con COPD <sup>1</sup>	2,2	ND

a) ROS: especies de oxígeno reactivas.

- 15 Los efectos de tratamiento con el compuesto (I) sobre neutrofilia en las vías respiratorias inducida por LPS en ratones y ratas se notifican en las tablas 8 y 9, respectivamente. Se encontró que el tratamiento produce una inhibición dependiente de la dosis de la neutrofilia inducida por LPS en ambas especies. Además, se encontró que los efectos inhibidores del tratamiento sobre la acumulación de células demuestran una larga duración de acción.

- 20 Tabla 8: Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre la neutrofilia en las vías respiratorias inducida por LPS en ratones.

Compuesto (I) (mg/ml)	Números de neutrófilos en BALF ( $\times 10^5$ /ml, media $\pm$ EEM) en el momento previo a la dosis indicado (% de inhibición)		
	2 h	8 h	12 h
Vehículo	17,1 $\pm$ 2,5	-	-
0,05	13,8 $\pm$ 2,5 (19)	-	-
0,2	8,0 $\pm$ 1,4 (53)	9,4 $\pm$ 2,0 (45)	13,1 $\pm$ 2,5 (23)
1,0	5,5 $\pm$ 0,9 (68)	-	-

N = 8 animales por grupo

- 25 Tabla 9: Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre la neutrofilia en las vías respiratorias inducida por LPS en ratas.

Compuesto (I) (mg/ml)	Números de neutrófilos en BALF ( $\times 10^5$ /ml, media $\pm$ EEM) en el momento previo a la dosis indicado (% de inhibición)		
	2 h	8 h	12 h
Vehículo	15,1 $\pm$ 2,6	-	-
0,05	13,2 $\pm$ 2,3 (9)	-	-
0,2	6,3 $\pm$ 1,6 (58)	10,1 $\pm$ 1,8 (33)	13,6 $\pm$ 2,7 (10)
1,0	4,1 $\pm$ 0,7 (73)	-	-

N = 8 animales por grupo

Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre la eosinofilia y neutrofilia en las vías respiratorias inducidas por exposición a alérgenos en ratones se notifican en la tabla 10. Se encontró que el tratamiento de ratones con el compuesto dado a conocer en el presente documento producía una inhibición dependiente de la dosis de la acumulación tanto de eosinófilos como de neutrófilos en el lavado broncoalveolar tras la exposición a alérgenos.

5 Tabla 10: Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre la eosinofilia y neutrofilia en las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina en ratones sensibilizados a la ovoalbúmina.

Compuesto (I) (mg/ml)	Números de células en BALF ( $\times 10^4$ /ml, media $\pm$ EEM) y (% de inhibición)	
	Eosinófilos	Neutrófilos
Vehículo	24,7 $\pm$ 3,1	9,8 $\pm$ 0,6
0,05	19,7 $\pm$ 3,2 (20)	8,0 $\pm$ 0,4 (18)
0,2	3,8 $\pm$ 0,9 (85)	2,9 $\pm$ 0,5 (70)
1	2,1 $\pm$ 0,4 (91)	2,0 $\pm$ 0,3 (80)

N = 8 animales por grupo

10 También se investigó el efecto de tratamiento con el compuesto (I) o con el compuesto A sobre la acumulación de macrófagos y neutrófilos en BALF tras la exposición de ratones a poli-I:C. En esta comparación directa, se encontró que el tratamiento o bien con el compuesto (I) o bien con el compuesto A producía una inhibición dependiente de la dosis de la acumulación de macrófagos y neutrófilos inducida por poli-I:C en BALF (tabla 11). Es destacable que el compuesto (I) muestra una potencia significativamente mayor que el compuesto A y estos datos se representan gráficamente para neutrófilos (figuras 1a y 1b).

15 Tabla 11: Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de células inducida por poli-I:C en las vías aéreas de ratones.

Tratamiento y dosis del compuesto (I) o del compuesto A (mg/ml)	Números de células en BALF <sup>a</sup> ( $\times 10^4$ /ml) y (% de inhibición)	
	Macrófagos	Neutrófilos
Vehículo	3,6 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,1
Vehículo + poli I:C	19,0 $\pm$ 0,5	11,6 $\pm$ 0,2
Compuesto (I) (0,002) + poli I:C	11,5 $\pm$ 0,2 (49)	7,3 $\pm$ 0,3 (43)
Compuesto (I) (0,02) + poli I:C	8,3 $\pm$ 0,3 (69)	5,0 $\pm$ 0,2 (65)
Compuesto (I) (0,2) + poli I:C	6,8 $\pm$ 0,3 (79)	3,8 $\pm$ 0,2 (77)
Compuesto A (0,02) + poli I:C	14,3 $\pm$ 0,3 (31)	8,9 $\pm$ 0,2 (26)
Compuesto A (0,2) + poli I:C	11,0 $\pm$ 0,4 (52)	7,3 $\pm$ 0,3 (42)
Compuesto A (2) + poli I:C	7,8 $\pm$ 0,2 (73)	4,8 $\pm$ 0,2 (67)

20 a) Los datos para los números de células se muestran como la media  $\pm$  EEM; N = 5 animales por grupo

Tabla 12: El efecto del tratamiento con el compuesto (I)  $\pm$  propionato de fluticasona sobre la acumulación de células inducida por humo de cigarrillos (CS) en BALF murino.

Tratamiento y dosis del compuesto (I) (mg/ml)	Números de células en BAL <sup>b</sup> ( $\times 10^4$ /ml) y (% de inhibición)	
	Macrófagos	Neutrófilos
Aire + vehículo	4,5 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2
CS + vehículo	17,9 $\pm$ 0,6	11,1 $\pm$ 0,5
CS + compuesto (I) (0,02)	13,6 $\pm$ 0,2 (32)	8,6 $\pm$ 0,2 (26)
CS + compuesto (I) (0,2)	9,5 $\pm$ 0,2 (63)	6,0 $\pm$ 0,1 (54)
CS + compuesto (I) (2)	7,4 $\pm$ 0,3 (79)	4,6 $\pm$ 0,1 (68)
CS + compuesto (I) (0,02) + FP <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 0,4 (32)	8,7 $\pm$ 0,2 (26)
CS + compuesto (I) (0,2) + FP <sup>a</sup>	9,4 $\pm$ 0,3 (63)	5,8 $\pm$ 0,3 (55)
CS + compuesto (I) (2) + FP <sup>a</sup>	7,0 $\pm$ 0,3 (81)	4,3 $\pm$ 0,2 (71)

25 N = 5 animales por grupo; a) FP = propionato de fluticasona dosificado a 50  $\mu$ g/ml; b) Los datos para los números de células se muestran como la media  $\pm$  EEM,

30 Se determinaron los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre la acumulación de macrófagos y neutrófilos en BALF tras la exposición al humo de cigarrillos (tabla 12). Se notificó que el modelo de humo de cigarrillos usado para este estudio era un sistema que no respondía al tratamiento con corticosteroides [To, Y. *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2010, 182:897-904; Medicherla, S. *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008, 324:921-9] y los datos revelan que la dexametasona (0,3-10 mg/kg, p.o.) era, tal como se anticipó, inactiva. Los efectos del tratamiento con el compuesto (I) sobre los neutrófilos de BALF y sobre los números de macrófagos alveolares activados demuestran que presenta actividad antiinflamatoria cuando se administra como monoterapia. Además, cuando el compuesto (I) se administró conjuntamente con propionato de fluticasona, a una dosis que carece de ningún efecto significativo como monoterapia, se detectó un aumento marcado de la actividad antiinflamatoria. En un estudio contemporáneo se evaluaron los efectos del tratamiento, con el compuesto A, de ratones expuesto a humo de cigarrillos. Una comparación de estos datos con los presentados anteriormente para el compuesto (I) demuestra que el compuesto

(I) es un inhibidor más potente de la acumulación de células inducida por el humo de cigarrillos en BALF murino que el compuesto A (figuras 2a y 2b).

La exposición al humo de tabaco también aumentó las concentraciones de los biomarcadores inflamatorios CXCL1, MCP1, TNF $\alpha$ , IL17, osteopontina y malondialdehído en el fluido de lavado broncoalveolar. El tratamiento con el compuesto (I) redujo las concentraciones de cada uno de los biomarcadores de una manera dependiente de la dosis. Además, el tratamiento tanto con compuesto (I) como con propionato de fluticasona en combinación mostró disminuciones mayores en las concentraciones de biomarcadores que lo que se conseguía con el tratamiento con el compuesto (I) solo (tabla 13).

Tabla 13: El efecto del tratamiento con el compuesto (I)  $\pm$  propionato de fluticasona sobre biomarcadores en BALF murino.

Biomarcador	Concentración de biomarcador en BALF frente al tratamiento (pg/ml)		Inhibición <sup>1</sup> (%)					
			Compuesto (I) (mg/ml)			Compuesto (I) (mg/ml) + FP <sup>2</sup>		
	Aire	Tabaco	0,02	0,2	2	0,002	0,02	0,2
CXCL1	8,4 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,3	32	52	71	32	58	77
MCP-1	2,3 $\pm$ 0,2	7,2 $\pm$ 0,1	28	45	78	29	53	73
TNF $\alpha$	1,5 $\pm$ 0,04	3,6 $\pm$ 0,1	22	38	62	22	39	64
IL-17	1,2 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1	27	41	60	26	51	67
Osteopontina	11 $\pm$ 0,3	23 $\pm$ 0,4	22	44	63	21	45	62
MDA	0,3 $\pm$ 0,02 <sup>3</sup>	1,6 $\pm$ 0,04 <sup>3</sup>	25	42	64	29	43	64

N = 5 animales por grupo; 1) Inhibición en porcentaje con respecto al tabaco, 2): propionato de fluticasona (0,5 mg/ml); 3) Estos datos son valores en  $\mu$ M; son valores de control de humo tras haber restado el control de aire

En resumen, el compuesto de la invención es un inhibidor potente de las isoformas de PI3K tanto  $\delta$  como  $\gamma$ . El perfil *in vitro* se traduce en un fenotipo antiinflamatorio ancho *in vivo*. En este entorno, los efectos inhibidores del compuesto dado a conocer en el presente documento frente a la acumulación de células inducida por poli I:C en las vías respiratorias son notables. También es particularmente sorprendente que, a diferencia de los inhibidores selectivos de PI3K  $\delta$ , el tratamiento con el compuesto (I) dado a conocer en el presente documento solo da como resultado una inhibición marcada de inflamación en las vías respiratorias inducida por el humo de cigarrillos y que estos efectos se producen a dosis menores cuando se administra conjuntamente con un corticosteroide, propionato de fluticasona, en condiciones en las que el tratamiento con el corticosteroide solo no tiene efecto.

#### Ejemplo 15 - Formulaciones farmacéuticas que comprenden el compuesto (I)

Una composición del compuesto (I) puede formularse para un inhalador de polvo seco tal como sigue:

El compuesto (I) se microniza mediante un método adecuado tal como un molino de chorro de aire para dar un valor de D50 de aproximadamente 2  $\mu$ m y entonces se formula en una combinación con o sin estearato de magnesio. La combinación se carga en contenedores de dosis unitaria (por ejemplo, cápsulas, blísteres) para la inhalación por medio de un inhalador de polvo seco. Se facilitan ejemplos de formulaciones que contienen entre el 0 y el 1% de estearato de magnesio, con un peso de carga de ejemplo de 25 mg por dosis y con una concentración de la dosis que oscila entre 1 y 1000 microgramos (mcg) por dosis. También pueden usarse diferentes concentraciones, diferentes cantidades de estearato de magnesio y diferentes pesos de carga por dosis.

Tabla 14: Formulaciones que contienen el 0% de estearato de magnesio  
% p/p

Concentración del material/producto mcg por dosis	1	5	25	100	250	1000
Compuesto de fórmula (I)	0,004	0,02	0,1	0,4	1	4
Lactosa para inhalación	99,996	99,98	99,9	99,6	99,0	96,0

## ES 2 640 624 T3

Tabla 15: Formulaciones que contienen el 0,5% de estearato de magnesio  
% p/p

Concentración del material/producto en mcg por dosis	1	5	25	100	250	1000
Compuesto de fórmula (I)	0,004	0,02	0,1	0,4	1	4
Estearato de magnesio	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Lactosa para inhalación	99,496	99,48	99,4	99,1	98,5	95,5

Tabla 16: Formulaciones que contienen el 1% de estearato de magnesio  
% p/p

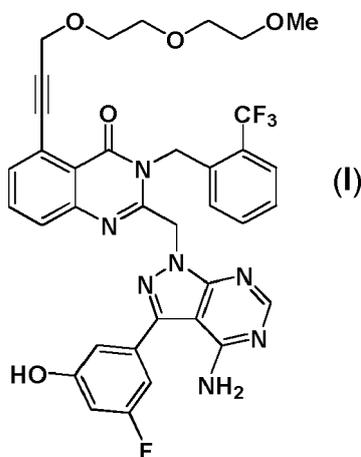
Concentración del material/producto mcg por dosis	1	5	25	100	250	1000
Compuesto de fórmula (I)	0,004	0,02	0,1	0,4	1	4
Estearato de magnesio	1	1	1	1	1	1
Lactosa para inhalación	98,996	98,98	98,9	98,6	98,0	95,0

- 5 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, implica la inclusión de un número entero, etapa, grupo de número enteros o grupo de etapas especificados, pero no a la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de número enteros o grupo de etapas.

10

## REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de fórmula (I)



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros, tautómeros y derivados isotópicos del mismo.

10 2.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, como base libre en forma de su polimorfo cristalino de forma 2 que tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 5.

3.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, como base libre en forma de su polimorfo cristalino de forma 3 que tiene un patrón de XRPD sustancialmente tal como se muestra en la Figura 12.

15 4.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en combinación con uno o más diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

20 5.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 4, que comprende además un segundo principio activo o uno adicional seleccionado por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos e inhibidores de p38 MAP cinasa.

6.- Un producto de combinación que comprende:

25 (A) un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(B) un principio activo adicional seleccionado por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos, inhibidores de fosfodiesterasas e inhibidores de p38 MAP cinasa.

30 en el que cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en una mezcla con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

7.- Una composición farmacéutica según la reivindicación 4 o un producto de combinación según la reivindicación 6, en el que el diluyente o portador farmacéuticamente aceptable es lactosa.

35

8.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento.

9.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso como medicamento que debe administrarse en combinación con uno o más principios activos adicionales seleccionados por ejemplo de corticosteroides, beta-agonistas, xantinas, antagonistas muscarínicos e inhibidores de p38 MAP cinasa.

40

10.- Un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 ó 7 o un producto de combinación según la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento o la prevención de un estado seleccionado de:

45

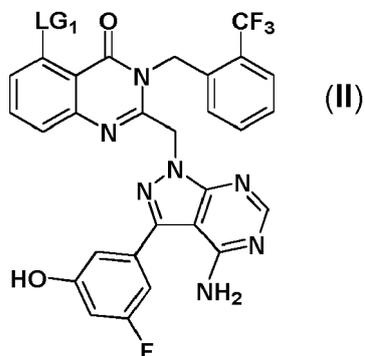
COPD (incluyendo bronquitis crónica y enfisema), asma, asma pediátrica, fibrosis quística, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, rinitis alérgica, rinitis, sinusitis, y agravamientos inducidos por virus de una cualquiera de las mismas, infección respiratoria vírica (incluyendo las complicaciones de la misma), conjuntivitis alérgica, conjuntivitis, dermatitis alérgica, dermatitis por contacto, psoriasis, colitis ulcerosa, articulaciones inflamadas derivadas de la artritis reumatoide u osteoartritis, artritis reumatoide, pancreatitis, caquexia, inhibición del crecimiento y metástasis

50

de tumores incluyendo carcinoma pulmonar de células no pequeñas, carcinoma de mama, carcinoma gástrico, carcinomas colorrectales y melanoma maligno.

11.- Un compuesto de fórmula (II):

5



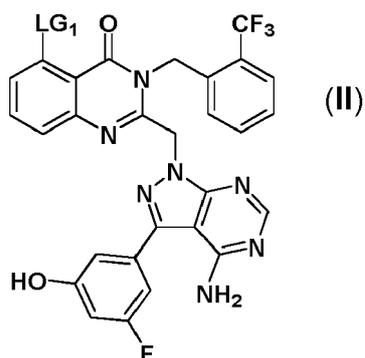
en el que LG<sub>1</sub> representa halógeno o un derivado protegido del mismo, en el que el grupo protector es un grupo sililo.

10

12.- Un proceso para preparar un compuesto de fórmula (I) según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende

hacer reaccionar un compuesto de fórmula (II)

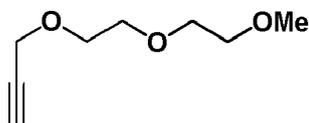
15



o un derivado protegido del mismo,

20

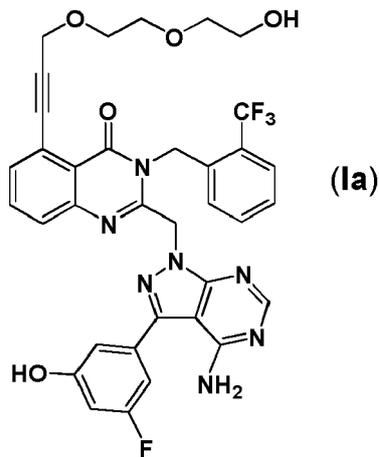
en el que LG<sub>1</sub> representa halógeno, con un fragmento:



25

en condiciones apropiadas para proporcionar el compuesto de fórmula (I) o un derivado protegido del mismo, en el que el grupo protector es un grupo sililo y, si es necesario, desproteger el compuesto protegido para dar un compuesto de fórmula (I).

13.- Un compuesto de fórmula (Ia)



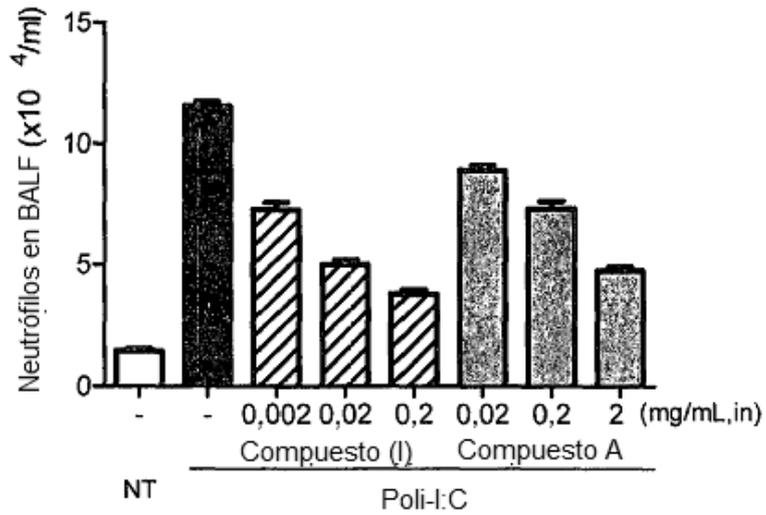
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, incluyendo todos los estereoisómeros, tautómeros y derivados isotópicos del mismo.

5 14.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1 como base libre en forma de su polimorfo cristalino de forma 2 que tiene un patrón de XRPD que contiene tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o los veintiún picos seleccionados de 8,2, 9,0, 9,2, 9,7, 12,2, 14,1, 14,3, 15,0, 16,4, 18,0, 18,5, 19,0, 19,6, 21,8, 22,3, 22,5, 24,3, 24,5, 24,8, 25,1 y 25,8 ( $\pm 0,2$  grados, valores 2-theta).

10 15.- Un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 14, que tiene un patrón de XRPD que contiene uno, dos, tres o cuatro picos seleccionados de 9,7, 12,2, 14,1 y 14,3 ( $\pm 0,2$  grados, valores 2-theta).

15

Los efectos de tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por poli-I:C en las vías respiratorias de ratones.



NT: sin tratamiento, in: intranasal

FIG. 1a

Comparación de las potencias inhibitoras del compuesto (I) con el compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por poli-I:C en las vías respiratorias de ratones

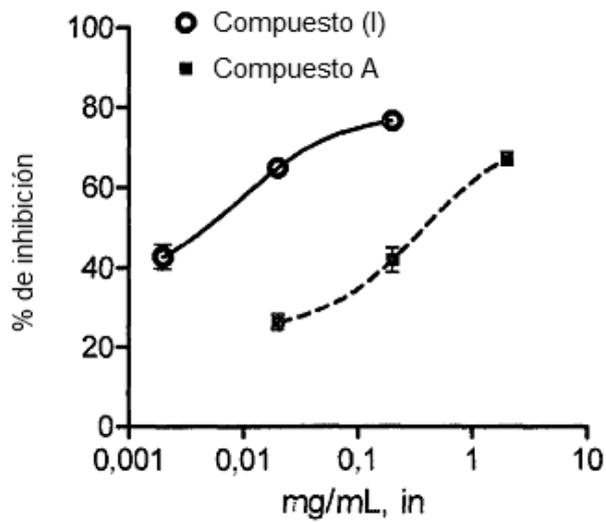


FIG. 1b

El efecto de tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de macrófagos inducida por el humo de cigarrillos en BALF murino.

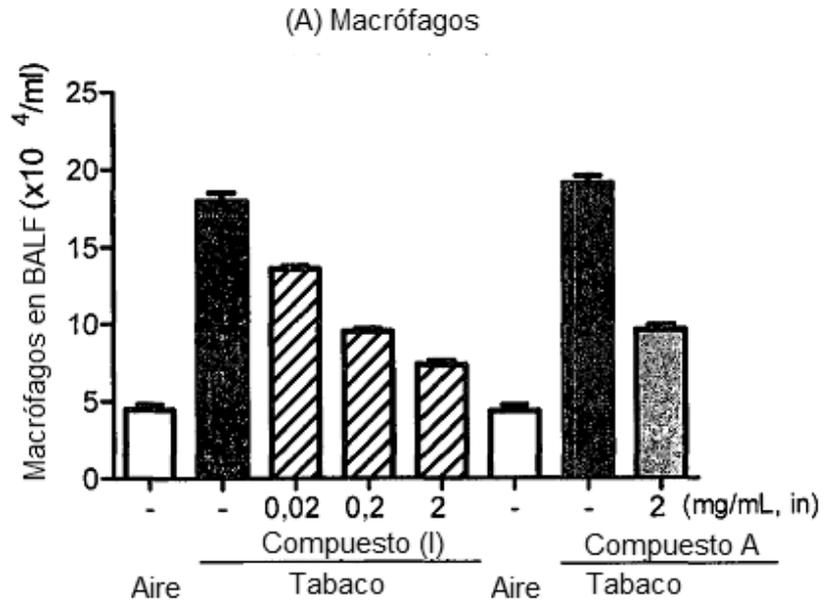


FIG. 2a

El efecto de tratamiento con el compuesto (I) o el compuesto A sobre la acumulación de neutrófilos inducida por el humo de cigarrillos en BALF murino.

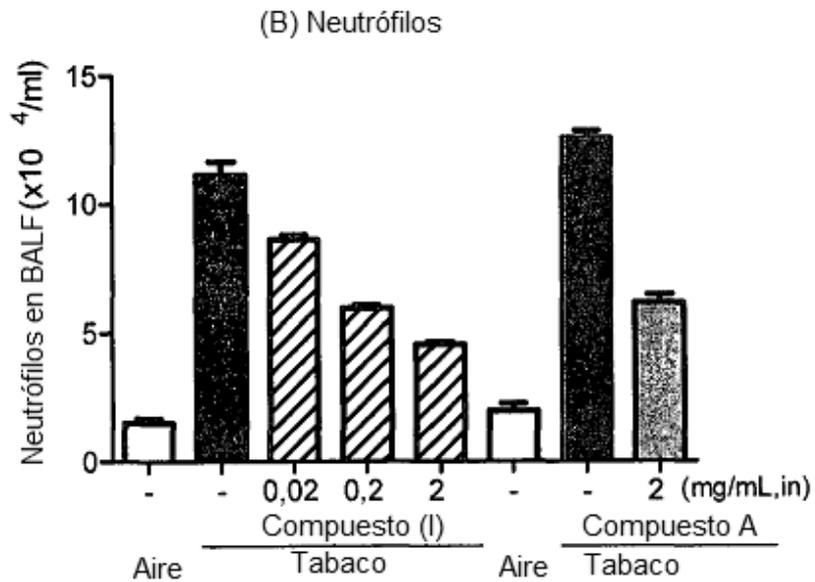


FIG. 2b

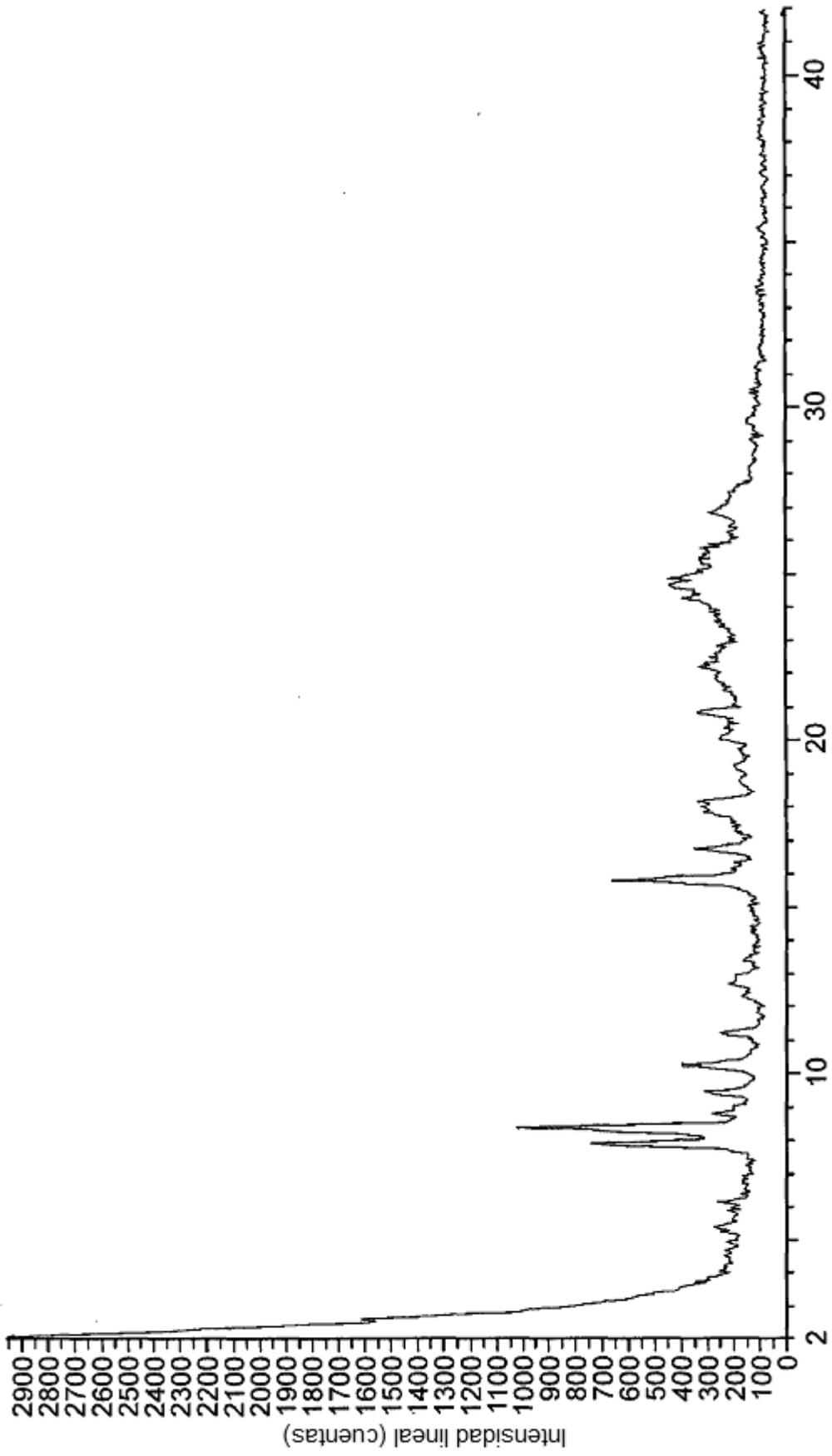


FIG. 3

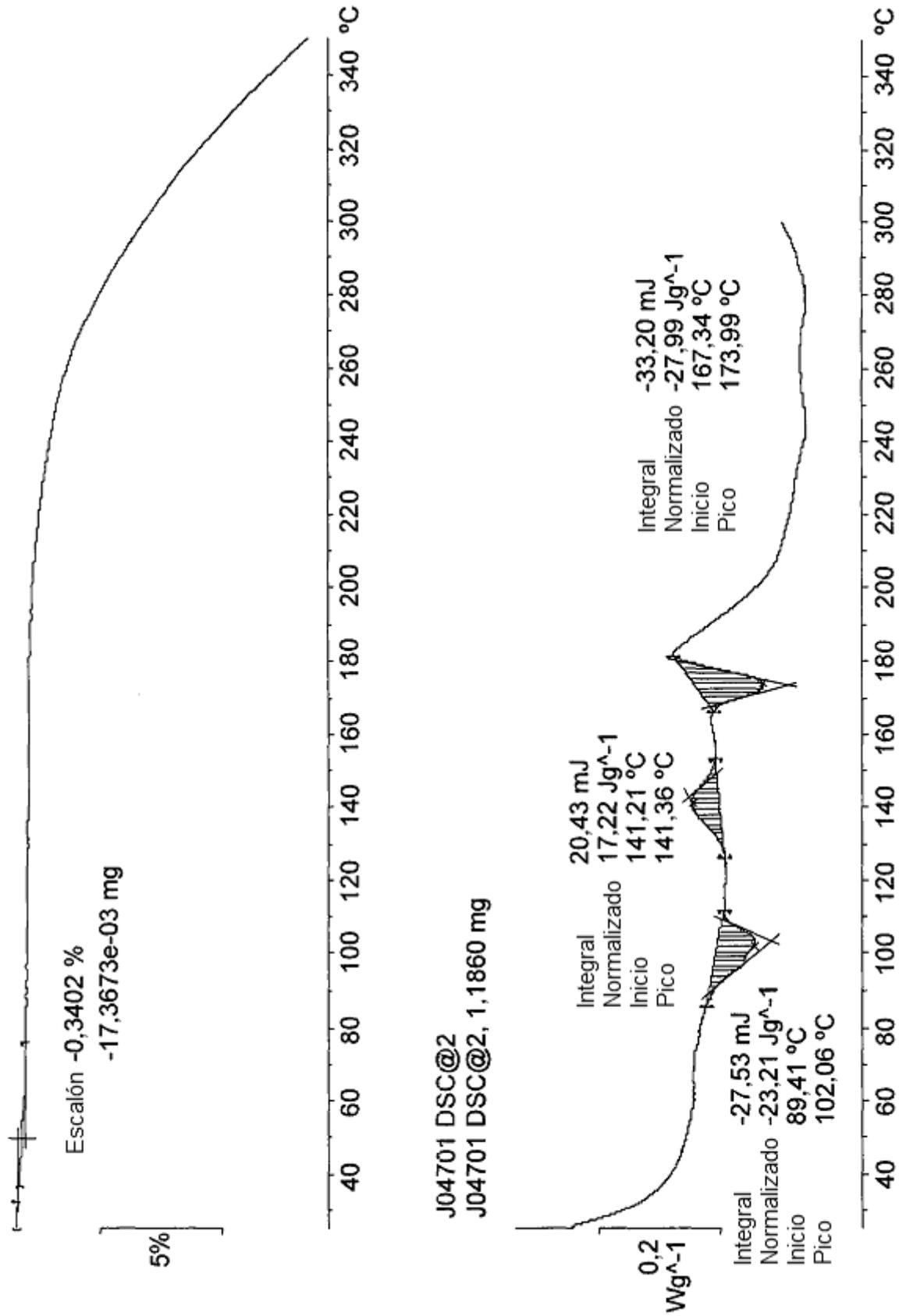


FIG. 4

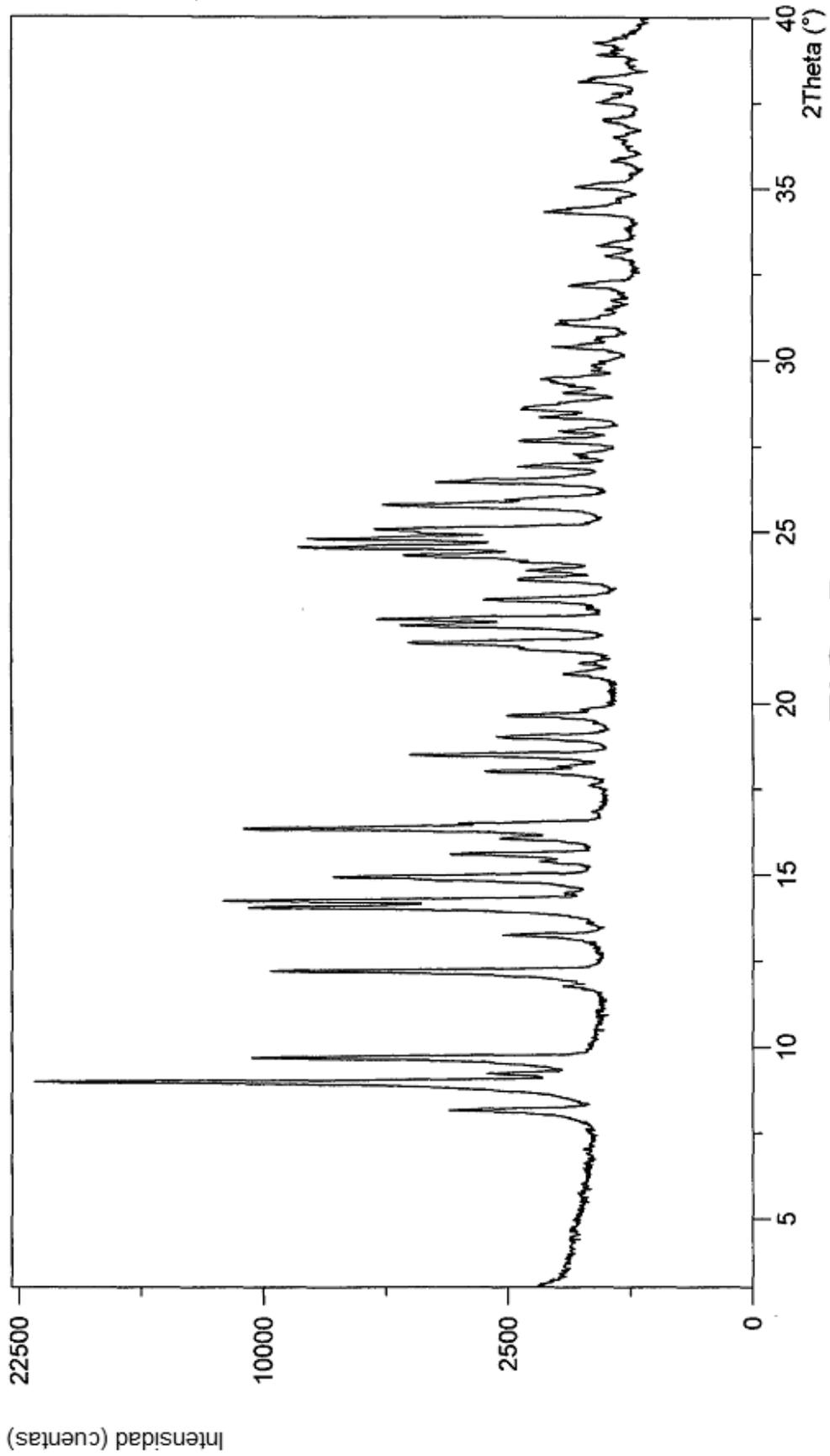


FIG. 5

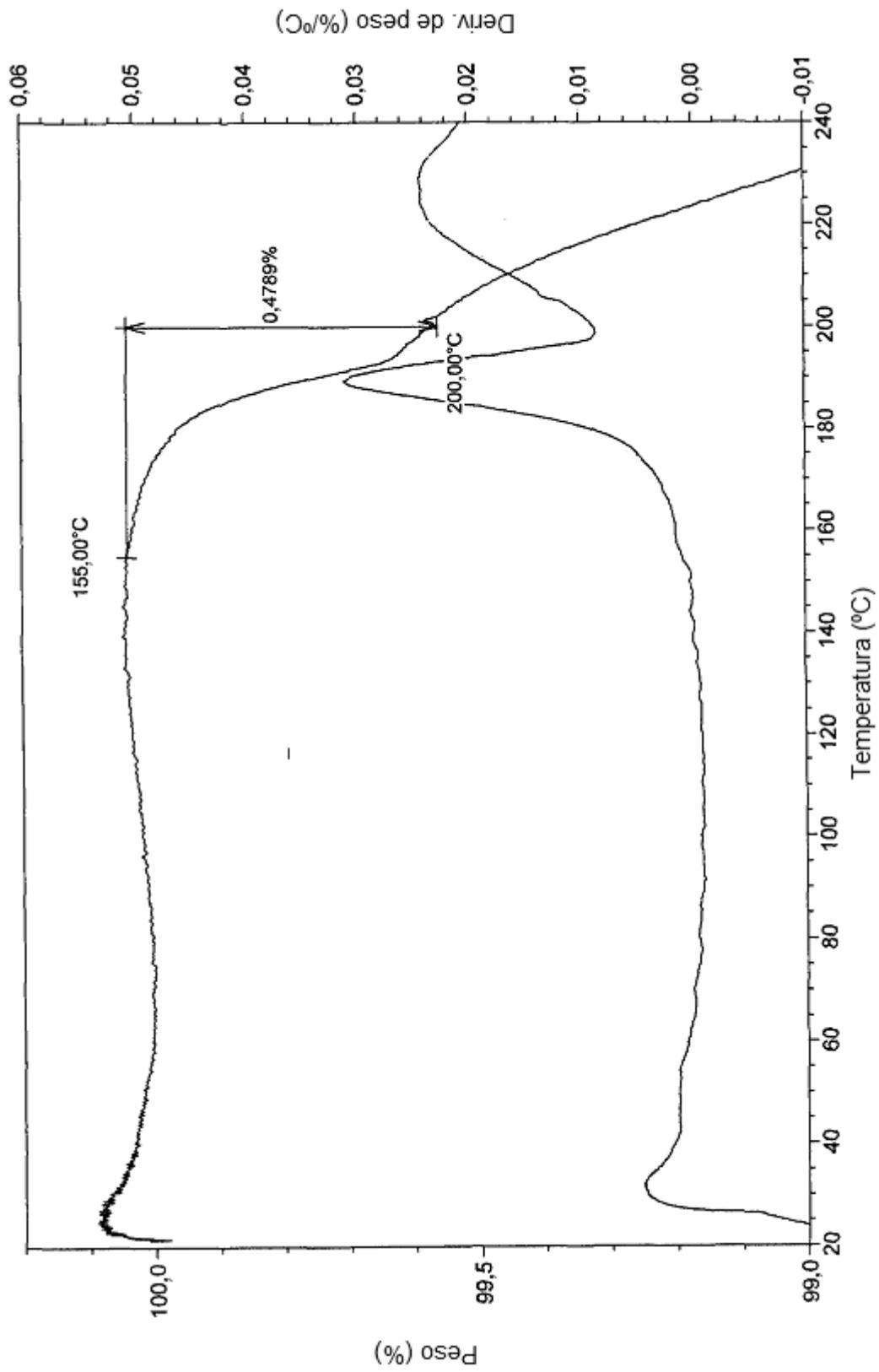


FIG. 6

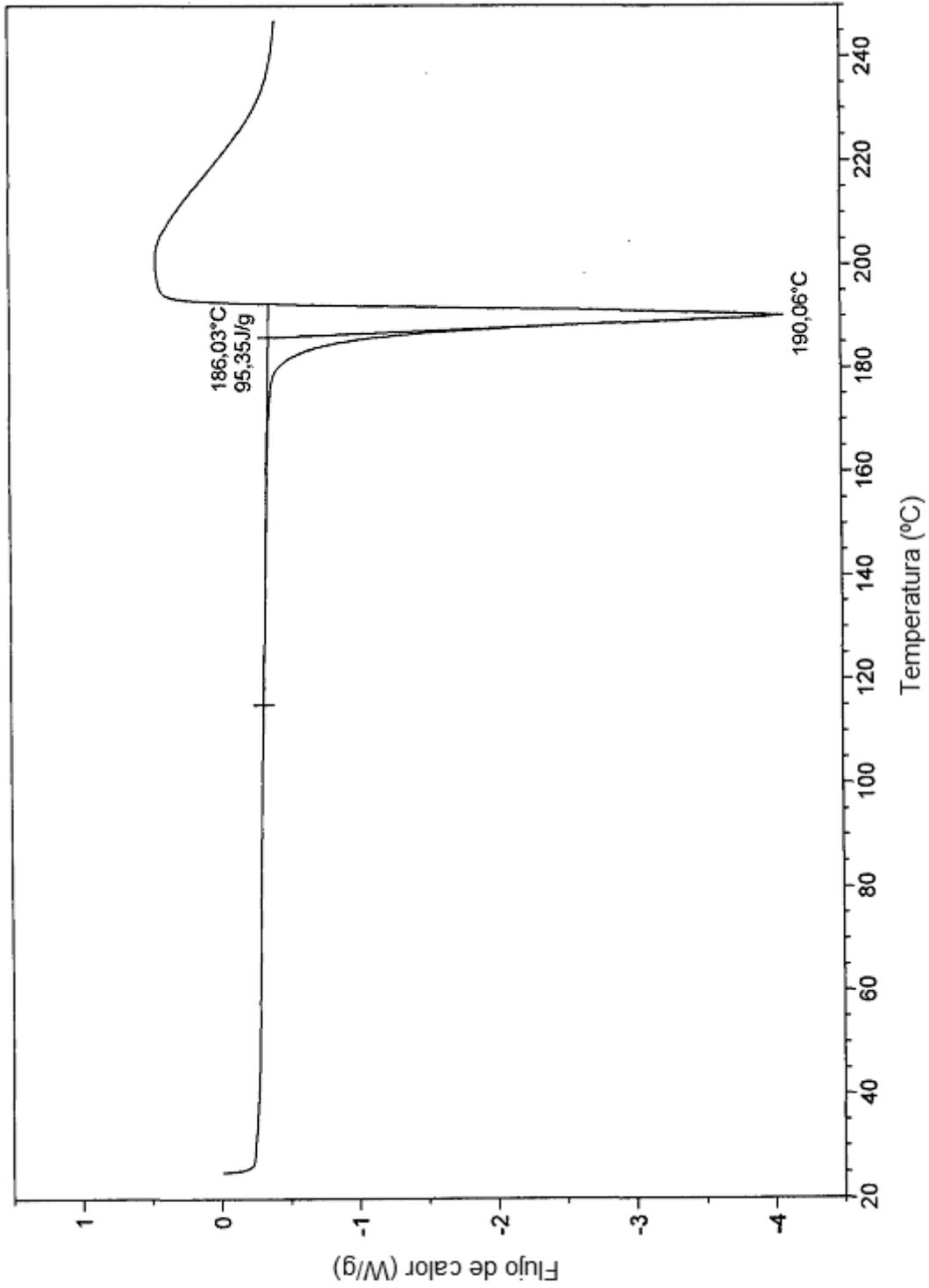


FIG. 7

Gráfico de isotermas de DVS

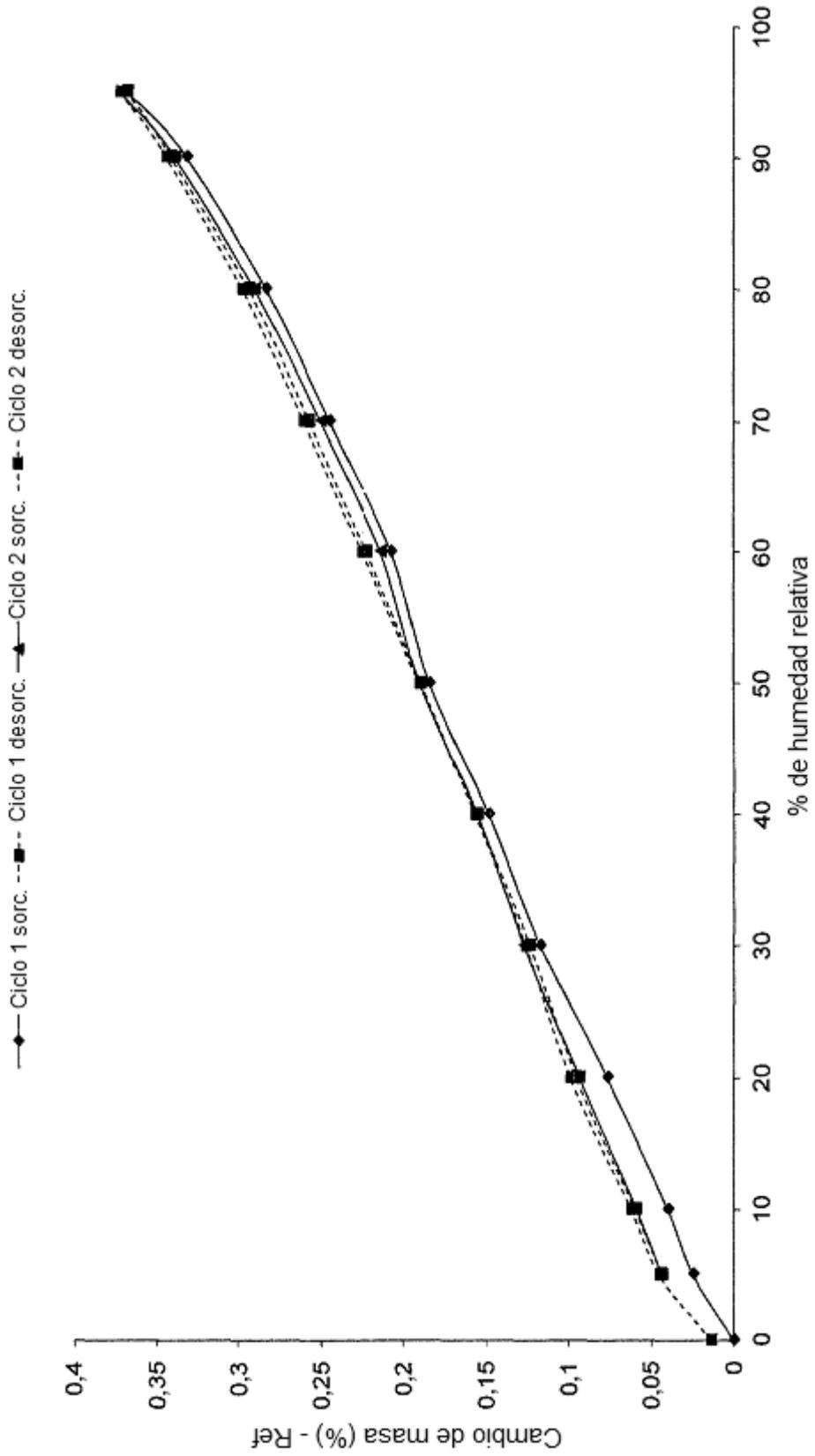


FIG. 8

Gráfico de cambio de masa de DVS (ref)

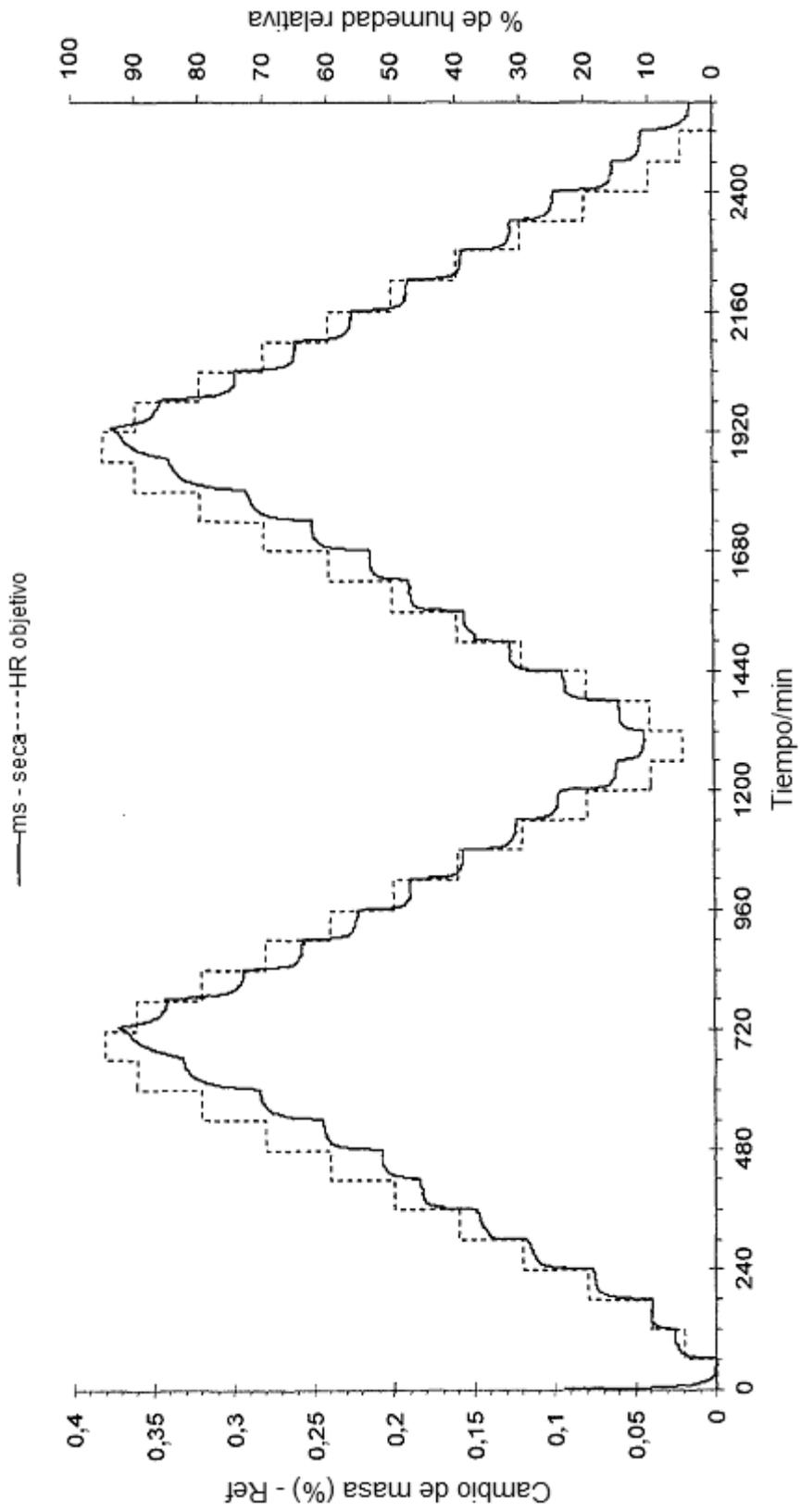


FIG. 9

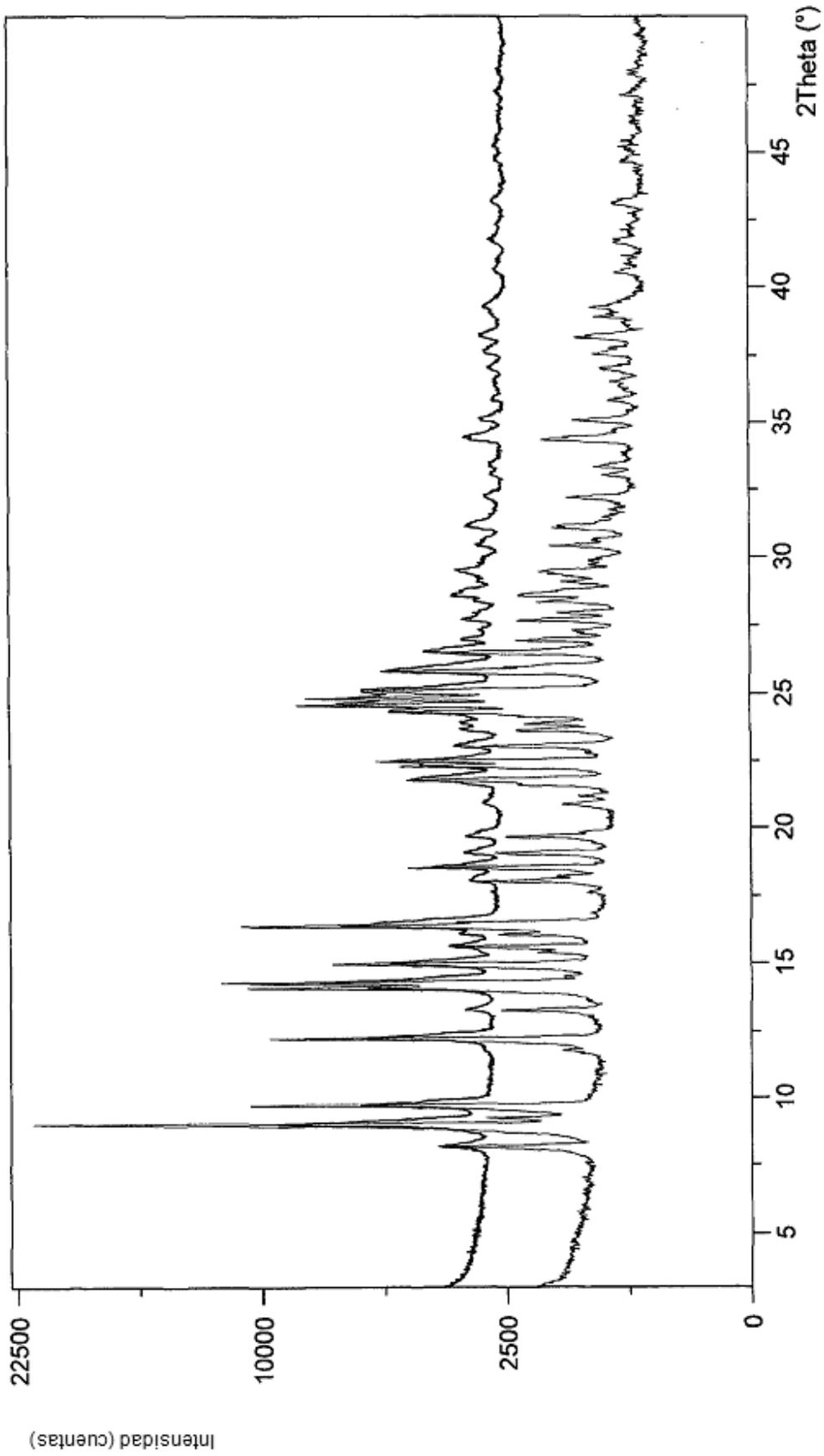
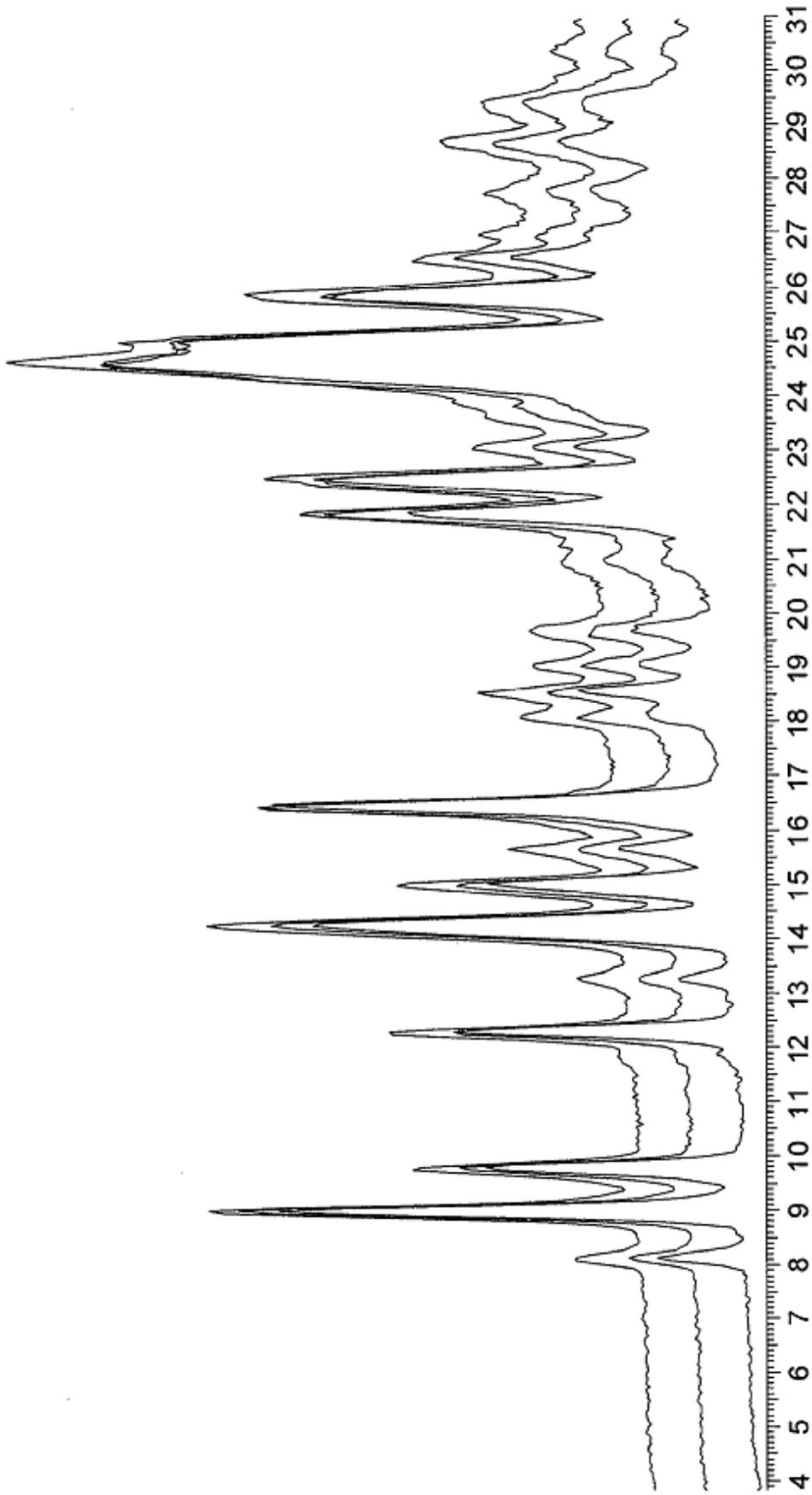
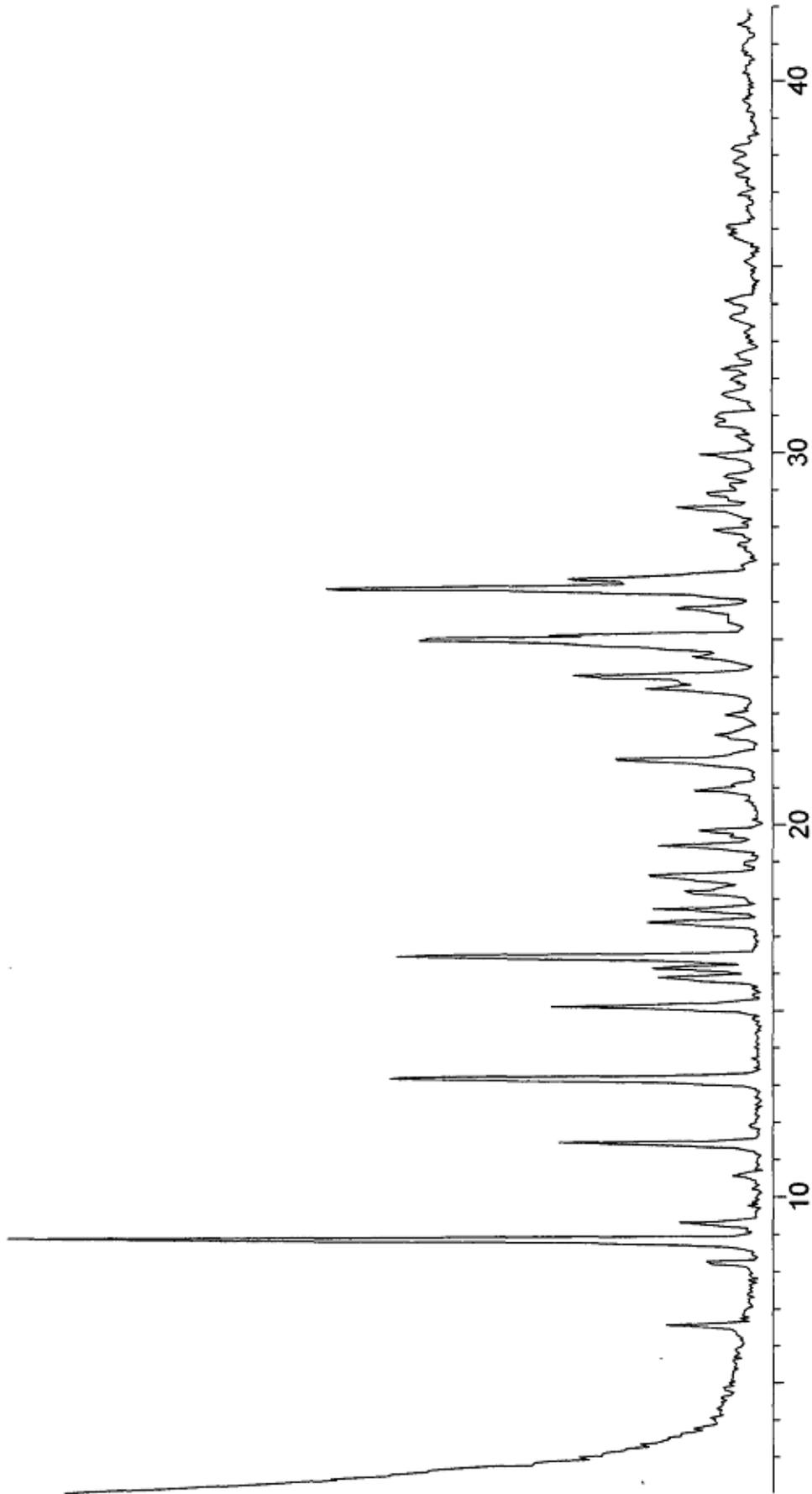


FIG. 10



Escala 2-Theta

**FIG. 11**



Escala 2-Theta

**FIG 12**

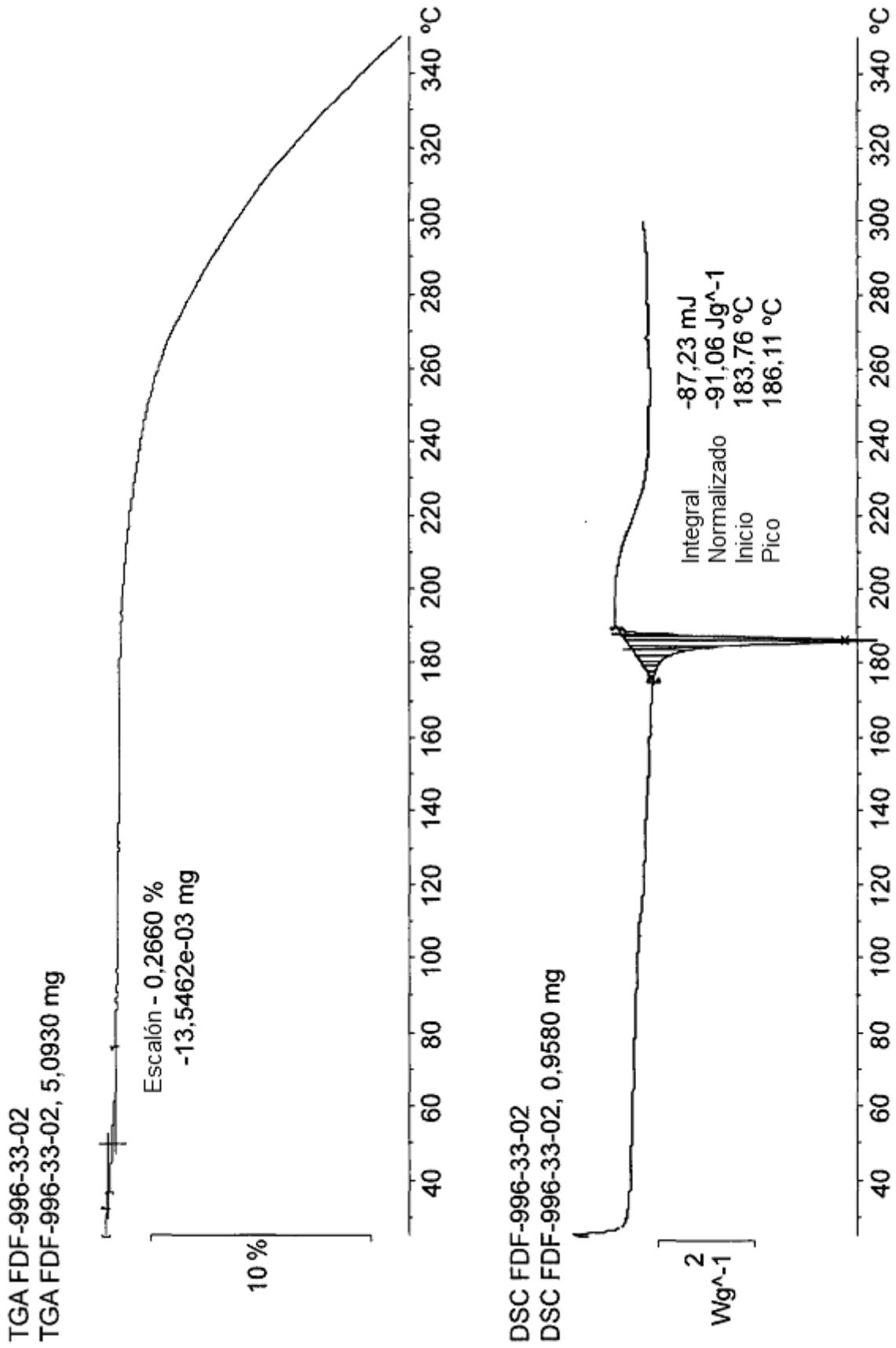


FIG. 13

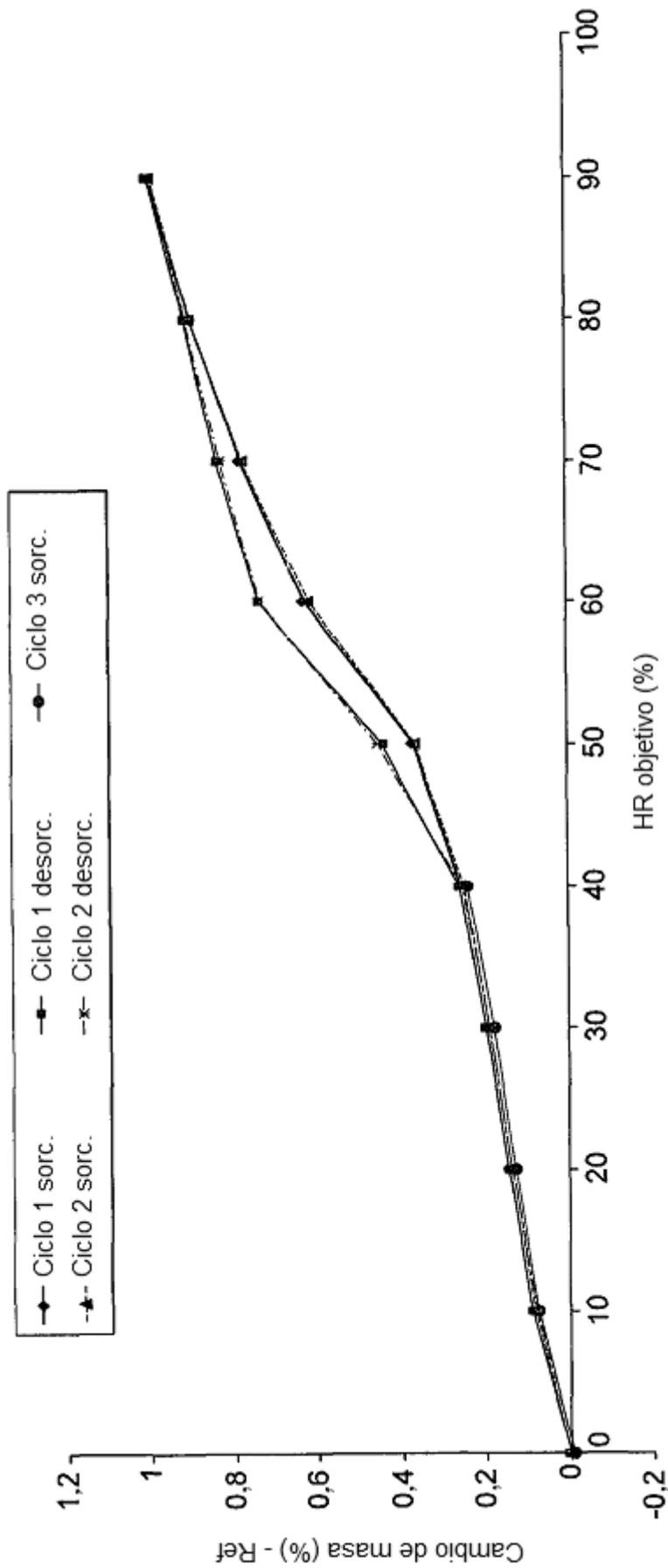
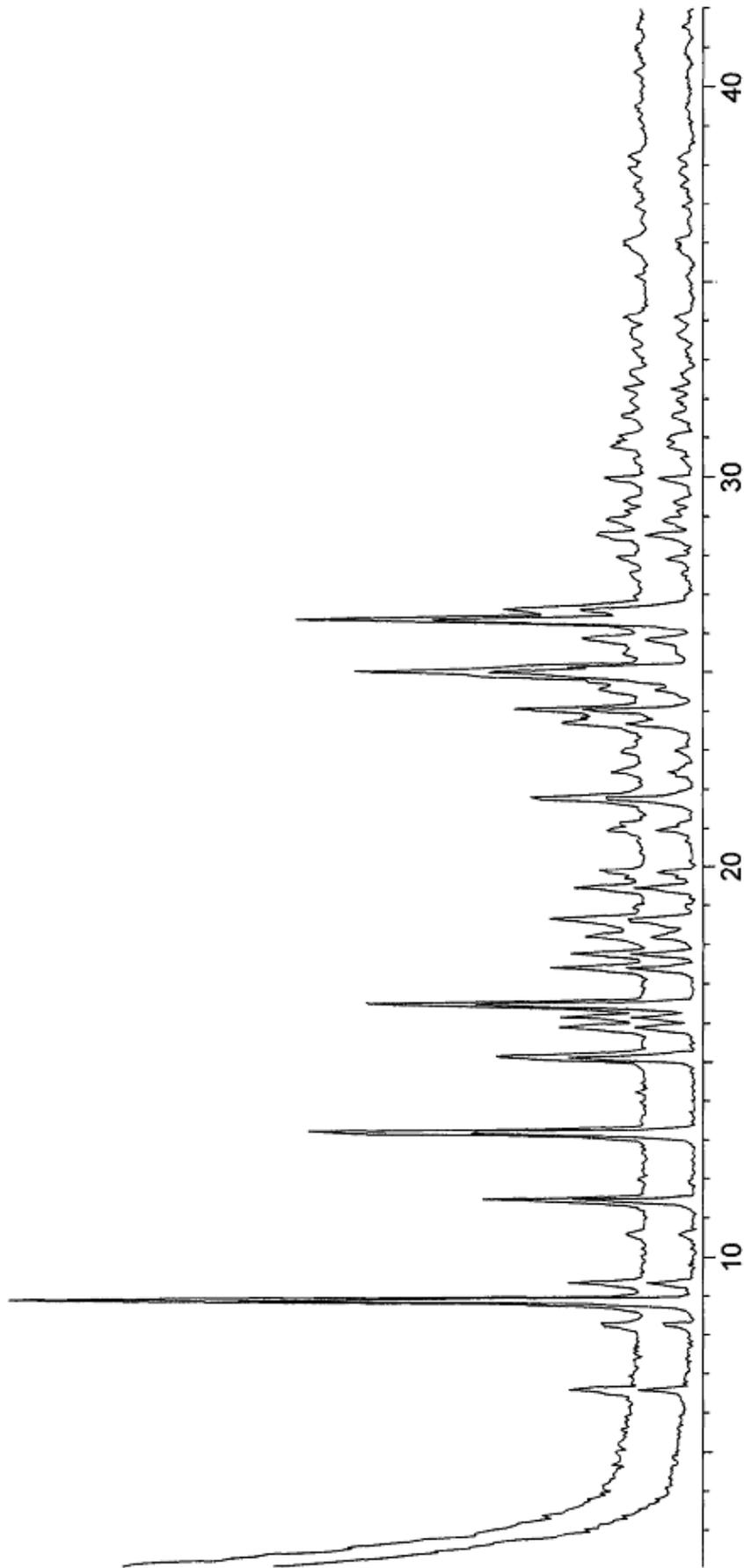
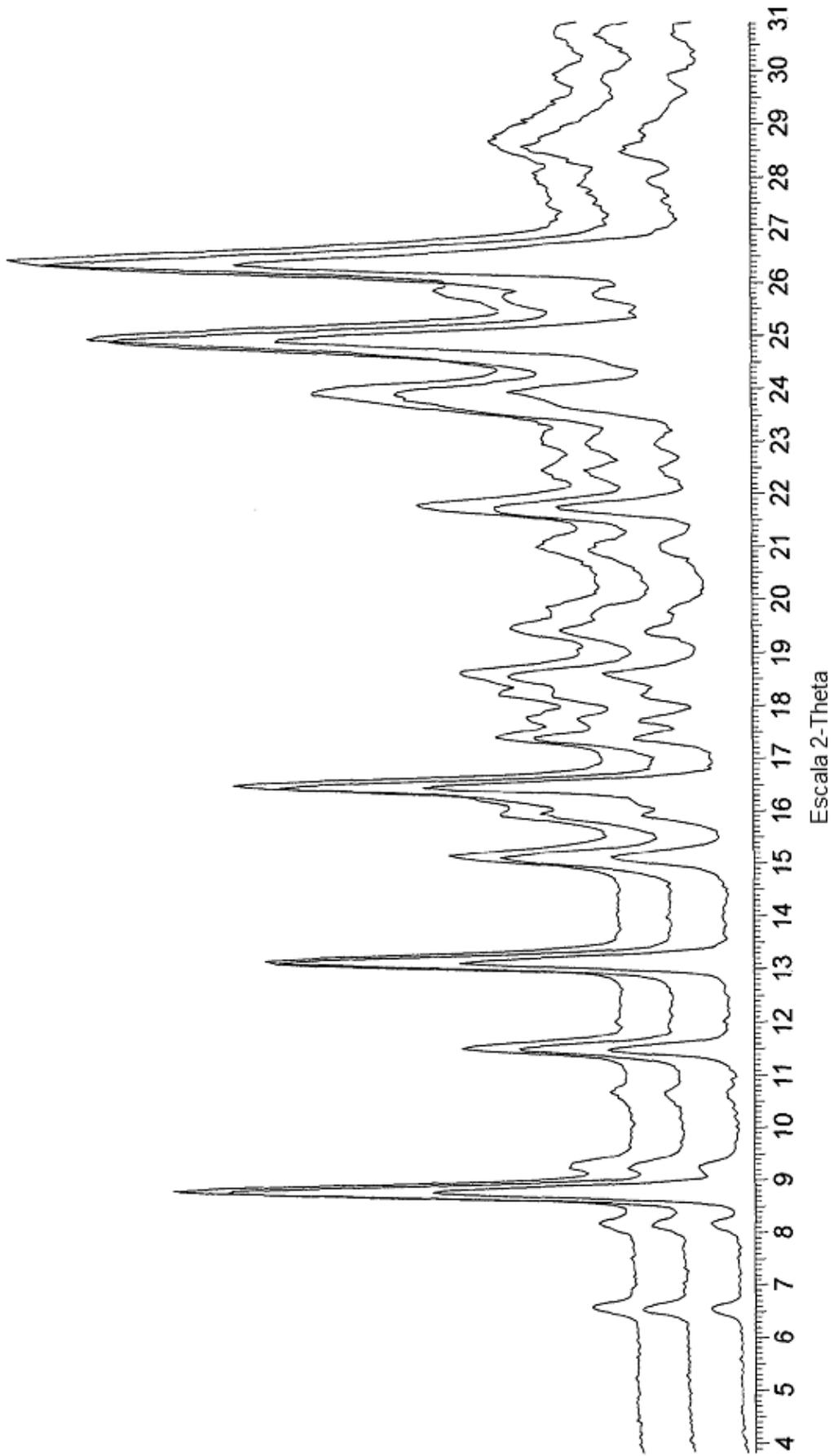


FIG. 14



Escala 2-Theta

**FIG. 15**



**FIG. 16**

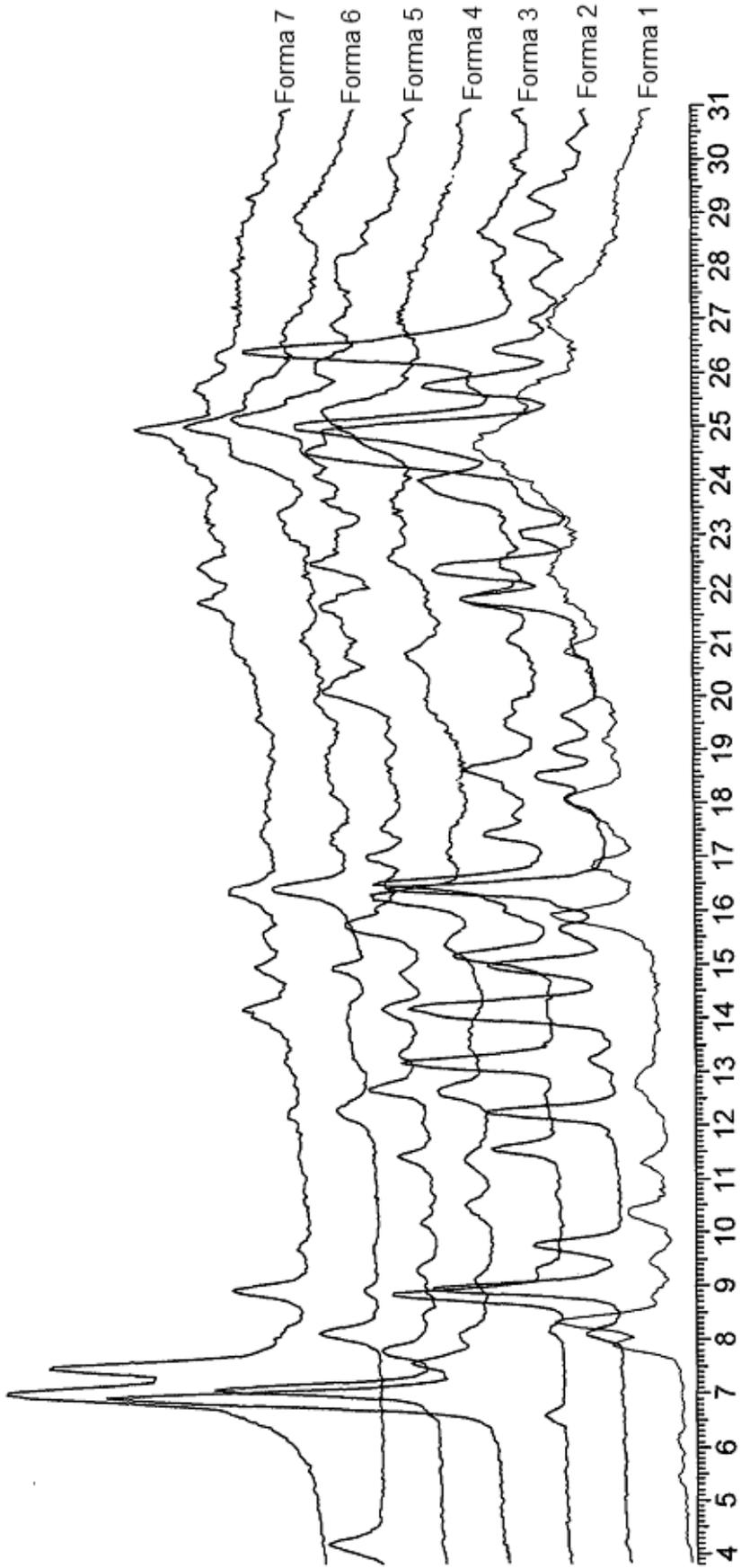


FIG. 17

56