

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 902**

51 Int. Cl.:

C07D 498/04 (2006.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/IB2013/060412**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14102630**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13824177 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2928896**

54 Título: **Forma sólida de un derivado de dihidro-pirido-oxazina**

30 Prioridad:

26.11.2012 GC P201222895

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

27.11.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HURTH, KONSTANZE;
KALIS, CHRISTOPH;
KAMMERTOENS, KAREN;
SOLDERMANN, NICOLAS y
ZECRI, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 643 902 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

Forma sólida de un derivado de dihidro-pirido-oxazina

Campo de la invención

5 La invención se refiere a una nueva forma sólida de un derivado de dihidro-pirido-oxazina, a los procesos para su preparación y su uso en composiciones farmacéuticas.

Antecedentes de la invención

10 La solicitud de patente internacional PCT/IB2012/057554, publicada como WO2013/093849 divulga derivados de dihidro-benzo-oxazina y dihidro-pirido-oxazina que son adecuados para el tratamiento de un trastorno o enfermedad que esté mediado por la actividad de las enzimas PI3K. El documento PCT/IB2012/057554, divulga (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona y métodos de fabricación de este compuesto.

15 Estos compuestos son útiles para el tratamiento, ya sea solos o en combinación con uno o más de otros compuestos farmacológicamente activos, de las enfermedades relacionadas con PI3K, incluyendo pero no limitado a trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades de las vías respiratorias, como el asma y la EPOC, rechazo de trasplantes, cánceres, por ejemplo de origen hematopoyético o tumores sólidos.

20 Estos compuestos también son útiles para el tratamiento, ya sea solos o en combinación con uno o más de otros compuestos farmacológicamente activos, de afecciones, enfermedades o trastornos, como por ejemplo, trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades de las vías respiratorias, como el asma y la EPOC, rechazo de trasplantes; producción de anticuerpos, presentación de antígenos, producción de citocinas u organogénesis linfoide anormales o indeseables, incluyendo artritis reumatoide, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, urticaria crónica autoinmune, alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, AMR (rechazo de trasplantes mediado por anticuerpos), rechazo de trasplantes hiperagudo, agudo y crónico mediado por células B, y cánceres de origen hematopoyético incluyendo pero no limitado a mieloma múltiple; una leucemia, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide; linfoma no Hodgkin, linfomas; policitemia vera, trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad de Walden Stroem; más adecuadamente de artritis reumatoide (RA), pénfigo vulgar (PV), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), hemofilia adquirida tipo A (AHA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), síndrome de Sjögren (SS), vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, urticaria crónica autoinmune (CAU), alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, rechazo de trasplantes y cánceres de origen hematopoyético, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección, por ejemplo, en la malaria severa y cerebral, tripanosomiasis, leishmaniosis, toxoplasmosis y neurocisticercosis.

35 Sumario de la invención

40 La invención se refiere a una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona; composiciones farmacéuticas y combinaciones que incluyen esta forma. La invención se refiere además esta forma, incluyendo sus composiciones farmacéuticas y combinaciones para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por la actividad de las enzimas PI3K, preferiblemente por la actividad de la isoforma PI3Kδ.

45 Es bien sabido que la forma cristalina del ingrediente farmacéutico activo (API) de un fármaco particular es a menudo un determinante importante de la facilidad de preparación del fármaco, de su higroscopicidad, estabilidad, solubilidad, estabilidad en almacenamiento, facilidad de formulación, tasa de disolución en fluidos gastrointestinales y biodisponibilidad in vivo. Las formas cristalinas se producen donde la misma composición de la materia se cristaliza en una disposición reticular diferente que resulta en diferentes propiedades termodinámicas y estabilidades específicas a la forma cristalina particular. Las formas cristalinas también pueden incluir diferentes hidratos o solvatos del mismo compuesto. Para decidir qué forma es preferible, las numerosas propiedades de las formas se comparan y la forma preferida se elige en base a las muchas variables de las propiedades físicas. Es totalmente posible que una forma pueda ser preferible en algunas circunstancias en las que ciertos aspectos tales como la facilidad de preparación, la estabilidad, etc., se consideran críticos. En otras situaciones, una forma diferente puede ser preferible para una mayor tasa de disolución y/o biodisponibilidad superior. Aún no es posible predecir si un compuesto particular formará polimorfos, si cualquiera de tales polimorfos serán adecuados para el uso comercial en una composición terapéutica, o cuales polimorfos mostrarían tales propiedades deseables.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es el patrón de difracción de rayos X en polvo del Ejemplo F1, forma anhidra cristalina

La Figura 2 es el gráfico de calorimetría diferencial de barrido del Ejemplo F1, forma anhidra cristalina

Descripción detallada de la invención

5 En una realización, la invención se refiere a una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona.

10 En otra realización, la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende los siguientes picos dados en grados 2-teta +/-0,2 grados: 9,1, 10,2, 11,9, 13,0, 17,1, 17,7, 18,7, 20,3, 20,8, 26,0, 26,7, 23,2, 24,1, 24,8, 29,3, 27,4, y 21,4.

En otra realización, la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona tiene un espectro de difracción de rayos X sustancialmente igual al espectro de difracción de rayos X de polvo mostrado en la Figura 1.

15 En otra realización, la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona es una que tiene un gráfico de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente el mismo que aquel mostrado en la Figura 2

20 A menos que se especifique lo contrario, la frase "forma de la presente invención" se refiere a una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona.

Los términos generales usados anteriormente en el presente documento y en lo sucesivo en el presente documento tienen preferentemente dentro del contexto de esta descripción los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

25 La invención puede apreciarse más completamente por referencia a la siguiente descripción incluyendo el siguiente glosario de términos y los ejemplos concluyentes. Como se usan en el presente documento, las frases "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se utilizan en el presente documento en su sentido abierto no limitativo.

30 Como se usa en el presente documento, la frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antimicóticos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservantes, estabilizadores de fármaco, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, y similares y combinaciones de los mismos, como se conocerá por aquellos expertos en la materia (véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en lo que respecta a cualquier vehículo convencional incompatible con el ingrediente activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

35 La frase "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad de el compuesto de la presente invención que producirá la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, reducción o inhibición de una enzima o una actividad proteica, o mejorar síntomas, aliviar afecciones, ralentizar o retrasar la progresión de la enfermedad, o prevenir una enfermedad, etc. En una realización no limitante, la frase "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es efectiva para (1) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una afección, o un trastorno o una enfermedad (i) mediada por PI3K, o (ii) asociada a actividad de PI3K, o (iii) caracterizada por actividad (normal o anormal) de PI3K; o (2) reducir o inhibir la actividad de PI3K; o (3) reducir o inhibir la expresión de PI3K. En otra realización no limitante, la frase "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a una célula, o un tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es efectiva para al menos parcialmente reducir o inhibir la actividad de PI3K; o al menos parcialmente reducir o inhibir la expresión de PI3K. El significado del término "una cantidad terapéuticamente efectiva" como se ilustra en la anterior realización para PI3K también aplica mediante el mismo medio a cualquier otros proteínas/péptidos/enzimas relevantes.

50 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a un animal. Típicamente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere a por ejemplo, primates (*por ejemplo*, humanos, hombres o mujeres), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En aún otras realizaciones, el sujeto es un humano.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibir", "inhibición" o "que inhibe" se refiere a la reducción o supresión de una afección, síntoma, o trastorno, o enfermedad dada, o una disminución significativa en la actividad basal de una actividad o proceso biológico.

5 Como se usa en el presente documento, el término "tratar", o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retrasar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (por ejemplo, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente, (por ejemplo, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

Como se usa en el presente documento, un sujeto está "en necesidad de" un tratamiento si tal sujeto se beneficia biológica o médicamente o mejora su calidad de vida a partir de tal tratamiento.

15 Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique claramente lo contrario por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo, por ejemplo, "tal como", proporcionada en el presente documento pretende solamente ilustrar mejor la invención y no implica limitación sobre el alcance de la invención de otra manera reivindicada.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede formularse para rutas particulares de administración tales como administración oral, administración parenteral, y administración rectal, etc. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden integrarse en una forma sólida (incluyendo sin limitación cápsulas, comprimidos, píldoras, gránulos, polvos o supositorios), o en una forma líquida (incluyendo sin limitación soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes lubricantes, o agentes tamponantes, así como también adyuvantes, tales como conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes y tampones, etc. Típicamente, las composiciones farmacéuticas son comprimidos o cápsulas de gelatina que comprenden el ingrediente activo junto con

- a) diluyentes, por ejemplo, lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa y/o glicina;
- 30 b) lubricantes, por ejemplo, silicio, talco, ácido esteárico, su sal de magnesio o calcio y/o polietilenglicol; para comprimidos también
- c) aglutinantes, por ejemplo, silicato de magnesio y aluminio, pasta de almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona; si se desea
- d) desintegrantes, por ejemplo, almidones, agar, ácido algínico o su sal de sodio, o mezclas efervescentes; y/o
- 35 e) absorbentes, colorantes, saborizantes y edulcorantes.

Los comprimidos pueden tener revestimiento de película o revestimiento entérico según métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones adecuadas para administración oral incluyen una cantidad eficaz de una forma de la presente invención en forma de comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleaginosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas a uso oral se preparan según cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consta de agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes con el objeto de proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y de sabor agradable. Los comprimidos pueden contener el ingrediente activo en mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos los cuales son apropiados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes son, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato de sodio, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes granulantes y desintegrantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglomerantes, por ejemplo, almidón, gelatina o acacia; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos son revestidos o no revestidos mediante técnicas conocidas para retrasar desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un periodo más largo de tiempo. Por ejemplo, puede utilizarse un material retardante tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formulaciones para uso oral pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo es mezclado con un diluyente sólido inerte, por

ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolina, o como cápsulas de gelatina suave en donde el ingrediente activo es mezclado con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de coco, parafina líquida o aceite de oliva.

5 Ciertas composiciones inyectables son soluciones o suspensiones acuosas isotónicas, y los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas. Dichas composiciones pueden ser esterilizadas y/o contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Dichas composiciones se preparan según métodos convencionales de mezclado, granulación o revestimiento, respectivamente, y contienen aproximadamente un 0,1-75 %, o contienen aproximadamente un 1-50 % del ingrediente activo.

10 Las composiciones apropiadas para aplicación transdérmica incluyen una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención con un vehículo apropiado. Los vehículos apropiados para liberación transdérmica incluyen solvatos farmacológicamente aceptables absorbentes para asistir en el pasaje a través de la piel del huésped. Por ejemplo, los dispositivos transdérmicos están en forma de un vendaje que comprende un miembro de soporte, un depósito que contiene el compuesto opcionalmente con vehículos, opcionalmente una barrera controladora de velocidad para liberar el compuesto de la piel del huésped a una velocidad controlada y predeterminada durante un periodo de tiempo prolongado, y medios para asegurar el dispositivo a la piel.

15 Las composiciones apropiadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, pomadas, cremas, geles o formulaciones pulverizables, por ejemplo, para liberación mediante aerosol o similares. Tales sistemas de liberación tópica serán en particular apropiados para aplicación dérmica, por ejemplo, para el tratamiento de cáncer de piel, por ejemplo, para uso profiláctico en cremas, lociones, atomizadores para el sol y similares. Por lo tanto son particularmente apropiados para utilizar en formulaciones tópicas incluyendo formulaciones cosméticas bien conocidas en la técnica. Tales pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes mejoradores de tonicidad, tampones y conservantes.

20 Como se usa en el presente documento una aplicación tópica también se refiere a una inhalación o a una aplicación intranasal. Estas pueden ser convenientemente liberadas en forma de un polvo seco (bien sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o como partículas de componentes mixtos, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, atomizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor apropiado.

25 La presente invención además proporciona composiciones farmacéuticas anhidridas y formas de dosificación que comprenden forma de la presente invención como ingredientes activos, puesto que el agua puede facilitar la degradación de ciertos compuestos.

30 Las composiciones farmacéuticas anhidridas y formas de dosificación de la invención pueden prepararse utilizando ingredientes anhidros o que contienen baja humedad y afecciones de baja humedad. Una composición farmacéutica anhidrida puede prepararse y almacenarse tal que su naturaleza anhidrida sea mantenida. Por consiguiente, composiciones anhidridas se envasan utilizando materiales conocidos para prevenir exposición al agua tal que éstas puedan incluirse en kits de formulación apropiados. Los ejemplos de envases apropiados incluyen, pero no están limitados a aluminios herméticamente sellados, plásticos, recipientes de dosis unitaria (por ejemplo, viales), envases de burbuja, y envases de tira.

35 La invención además proporciona composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que comprenden uno o más agentes que reducen la velocidad mediante la cual el compuesto de la presente invención como un ingrediente activo se descompondrá. Tales agentes, los cuales se conocen en el presente documento como "estabilizadores," incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes tales como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones de sales, etc.

40 Una forma de la presente invención puede ser útil en el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos, incluyendo inmunopatología asociada a enfermedad o infección en el que una o más de las funciones de las células B tales como producción de anticuerpos, presentación de antígenos, producción de citocinas u organogénesis linfoide, son anormales o son indeseables incluyendo artritis reumatoide, pénfigo vulgar y enfermedades relacionadas, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, urticaria crónica autoinmune, alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, AMR (rechazo de trasplantes mediado por anticuerpos), rechazo de trasplantes hiperagudo, agudo y crónico mediado por células B y cánceres de origen hematopoyético incluyendo pero no limitado a mieloma múltiple; leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica; leucemia linfocítica, leucemia mieloide, linfoma no Hodgkin, linfomas, policitemia vera, trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad de Walden Stroem.

La invención incluye tratar afecciones, enfermedades o trastornos en los que una o más de las funciones de los neutrófilos, tales como la liberación de superóxido, exocitosis estimulada, migración quimiotáctica son anormales o no son deseables incluyendo artritis reumatoide, sepsis, trastornos pulmonares o respiratorios, tales como asma, dermatosis inflamatorias tales como psoriasis, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección y otros.

5

La invención incluye métodos para el tratamiento de afecciones, enfermedades o trastornos en los que una o más de las funciones de las células de basófilos y mastocitos, tales como la migración quimiotáctica o desgranulación de alérgenos mediada por IgE son anormales o no son deseables incluyendo enfermedades alérgicas (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), así como otros trastornos tales como EPOC, asma o enfisema.

10 La invención incluye tratar afecciones, enfermedades o trastornos en los que una o más de las funciones de las células T, tales como la producción de citocinas o la citotoxicidad mediada por células son anormales o indeseables incluyendo la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, rechazo agudo o crónico de tejido celular o injertos de órganos o cánceres de origen hematopoyético, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección.

15 Además, la invención incluye tratar enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y agregación plaquetaria.

Además, la invención incluye métodos para tratar enfermedades de la piel tales como la porfiria cutánea tarda, erupción polimorfa lumínica, dermatomiositis, urticaria solar, liquen plano oral, paniculitis, esclerodermia, vasculitis urticaria.

Además, la invención incluye tratar enfermedades inflamatorias crónicas tales como sarcoidosis, granuloma anular.

20 En otras realizaciones, la afección o trastorno (por ejemplo, mediada por PI3K) se selecciona del grupo que consta de: policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis con metaplasia mieloide, asma, EPOC, ARDS, síndrome de Loffler, neumonía eosinofílica, infestación parasitaria (en particular metazoos) (incluyendo eosinofilia tropical), aspergilosis broncopulmonar, poliarteritis nodosa (incluyendo síndrome de Churg-Strauss), granuloma eosinofílico, trastornos relacionados con eosinófilos que afectan las vías respiratorias ocasionados por reacción a fármacos, psoriasis, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, alopecia areata, eritema multiforme, dermatitis herpetiforme, esclerodermia, vitíligo, vasculitis debida a hipersensibilidad, urticaria, penfigoide ampoloso, lupus eritematoso, pénfigo, epidermólisis bullosa adquirida, trastornos autoinmunes hematológicos (por ejemplo, anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de los glóbulos rojos y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis crónica activa, miastenia gravis, síndrome de Steven-Johnson, psoriasis idiopática, enfermedad autoinmune inflamatoria del intestino (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, alveolitis, neumonitis crónica por hipersensibilidad, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, uveítis (anterior y posterior), fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriática, glomerulonefritis, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolismo, embolia pulmonar, enfermedades trombolíticas, isquemia arterial aguda, oclusiones trombóticas periféricas, y la enfermedad arterial coronaria, lesiones por reperfusión, retinopatía, tales como retinopatía diabética o retinopatía hiperbárica inducida por oxígeno, y enfermedades caracterizadas por la presión intraocular elevada o secreción del humor acuoso ocular, tal como glaucoma.

40 En otra realización, una forma de la presente invención es útil en el tratamiento, prevención, o mejora de la enfermedad autoinmune y de estados inflamatorios, en particular estados inflamatorios con una etiología que incluye un componente autoinmune tal como artritis (por ejemplo artritis reumatoide, artritis crónica progresiva y artritis deformante) y enfermedades reumáticas, incluyendo afecciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que involucran pérdida ósea, dolor inflamatorio, espondiloartropatías incluyendo espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis reactiva, artritis psoriásica, artritis y enterofática, hipersensibilidad (incluyendo tanto la hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica) y alergias. Enfermedades autoinmunes específicas para las que pueden emplearse formas de la invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo por ejemplo anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de los glóbulos rojos y trombocitopenia idiopática), hemofilia A adquirida, enfermedad de aglutinina fría, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, trastornos musculares inflamatorios, policondritis, esclerodermia, vasculitis asociada a anticuerpos citoplásmicos anti-neutrófilos, neuropatía mediada por IgM, síndrome de mioclonía opsoclono, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia grave, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, pénfigo vulgar, pénfigo foliacius, diarrea grasa idiopática, enfermedad inflamatoria autoinmune del intestino (incluyendo por ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome de intestino irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior, intermedia y posterior, así como panuveítis), queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriática y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo, incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo), tumores, enfermedad inflamatoria de la piel y la córnea, miositis, aflojamiento de implantes óseos, trastornos metabólicos, tales como aterosclerosis, diabetes, y dislipidemia.

55

En otra realización, una forma de la presente invención es útil en el tratamiento de afecciones o trastornos seleccionados del grupo que consiste en, linfoma primario cutáneo de células B, enfermedad inmunobullosa, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, forma endémica de pénfigo brasileño (Fogo selvagem), pénfigo paraneoplásico, penfigoide ampolloso, penfigoide de la membrana mucosa, epidermólisis ampollosa adquirida, enfermedad crónica de injerto contra huésped, dermatomiositis, lupus eritematoso sistémico, vasculitis, vasculitis de pequeños vasos, vasculitis urticarial hipocomplementémica, vasculitis debida a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos, crioglobulinemia, síndrome de Schnitzler, macroglobulinemia de Waldenstrom, angioedema, vitiligo, lupus eritematoso sistémico, lpúrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, enfermedad por crioglobulinas, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos, enfermedad de injerto contra huésped, crioglobulinemia y trombocitopénica trombótica.

Así, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona en terapia. En una realización adicional, la terapia se selecciona de una enfermedad que puede ser tratada por la inhibición de PI3K. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista anteriormente mencionada, adecuadamente de trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades de las vías respiratorias, tales como asma y EPOC, rechazo de trasplantes, producción de anticuerpos, presentación de antígenos, producción de citocinas u organogénesis linfóide son anormal o son indeseables incluyendo la artritis reumatoide, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, urticaria crónica autoinmune, alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, AMR (rechazo del trasplante mediado por anticuerpos), rechazo de trasplantes hiperagudo, agudo y crónico mediado por células B y cánceres de origen hematopoyético incluyendo pero no limitados a mieloma múltiple; una leucemia; leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide; linfoma no Hodgkin; linfomas; policitemia vera, trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad Stroem Walden; más adecuadamente entre artritis reumatoide (RA), pénfigo vulgar (PV), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), hemofilia adquirida tipo A (AHA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), síndrome de Sjögren (SS), vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, urticaria crónica autoinmune (CAU), alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, rechazo de trasplantes y cánceres de origen hematopoyético, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección, por ejemplo, en malaria severa y cerebral, tripanosomiasis, leishmaniosis, toxoplasmosis y neurocisticercosis.

En otra realización, la invención proporciona un método de tratar una enfermedad que es tratada por la inhibición de PI3K que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente aceptable de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista anteriormente mencionada, adecuadamente de trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades de las vías respiratorias, tales como asma y EPOC, rechazo de trasplantes, producción de anticuerpos, presentación de antígenos, producción de citocinas u organogénesis linfóide son anormal o son indeseables incluyendo la artritis reumatoide, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, urticaria crónica autoinmune, alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, AMR (rechazo del trasplante mediado por anticuerpos), rechazo de trasplantes hiperagudo, agudo y crónico mediado por células B y cánceres de origen hematopoyético incluyendo pero no limitados a mieloma múltiple; una leucemia; leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide; linfoma no Hodgkin; linfomas; policitemia vera, trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad Stroem Walden; más adecuadamente entre artritis reumatoide (RA), pénfigo vulgar (PV), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), hemofilia adquirida tipo A (AHA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MG), síndrome de Sjögren (SS), vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, urticaria crónica autoinmune (CAU), alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, rechazo de trasplantes y cánceres de origen hematopoyético, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección, por ejemplo, en malaria severa y cerebral, tripanosomiasis, leishmaniosis, toxoplasmosis y neurocisticercosis.

Así, como una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona para la fabricación de un medicamento. En una realización adicional, el medicamento es para el tratamiento de una enfermedad que puede ser tratada por la inhibición de PI3K. En otra realización, la enfermedad se selecciona de la lista anteriormente mencionada, adecuadamente de trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, enfermedades alérgicas, enfermedades de las vías respiratorias, tales como asma y EPOC, rechazo de trasplantes, producción de anticuerpos, presentación de antígenos, producción de citocinas u organogénesis linfóide son anormal o son indeseables incluyendo la artritis reumatoide, pénfigo vulgar, púrpura trombocitopénica idiopática lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de

5 Sjögren, anemia hemolítica autoinmune, vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, urticaria crónica autoinmune, alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, AMR (rechazo del trasplante mediado por anticuerpos), rechazo de trasplantes hiperagudo, agudo y crónico mediado por células B y cánceres de origen hematopoyético incluyendo pero no limitados a mieloma múltiple; una leucemia; leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia mieloide; linfoma no Hodgkin; linfomas; policitemia vera, trombocitemia esencial; mielofibrosis con metaplasia mieloide, y enfermedad Stroem Walden; más adecuadamente entre artritis reumatoide (RA), pénfigo vulgar (PV), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), hemofilia adquirida tipo A (AHA), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), miastenia grave (MS), síndrome de Sjögren (SS), vasculitis asociadas a ANCA, crioglobulinemia, urticaria crónica autoinmune (CAU), alergia (dermatitis atópica, dermatitis de contacto, rinitis alérgica), síndrome de Goodpasture, rechazo de trasplantes y cánceres de origen hematopoyético, así como en inmunopatología asociada a enfermedad o infección, por ejemplo, en malaria severa y cerebral, tripanosomiasis, leishmaniosis, toxoplasmosis y neurocisticercosis.

15 La composición farmacéutica o combinación de la presente invención puede ser en dosificación unitaria de 1-1000 mg aproximadamente de ingrediente o ingredientes activos para un sujeto de 50-70 kg aproximadamente, o 1-500 mg aproximadamente o 1-250 mg aproximadamente o 1-150 mg aproximadamente o 0,5-100 mg aproximadamente, o 1-50 mg aproximadamente de ingredientes activos. La dosificación terapéuticamente efectiva de un compuesto, la composición farmacéutica, o las combinaciones de los mismos, es dependiente de la especie del sujeto, el peso corporal, edad y afección individual, el trastorno o enfermedad o la severidad de la misma. Un médico, médico
20 clínico o veterinario con experiencia común puede fácilmente determinar la cantidad efectiva de cada uno de los ingredientes activos necesarios para prevenir, tratar o inhibir el progreso del trastorno o enfermedad.

25 Las propiedades de dosificación antes citadas son demostrables en pruebas *in vitro* e *in vivo* utilizando de manera ventajosa mamíferos, *por ejemplo*, ratones, ratas, perros, monos u órganos aislados, tejidos y preparaciones de los mismos. Una forma de la presente invención puede aplicarse *in vitro* en forma de soluciones, por ejemplo, soluciones acuosas, e *in vivo* bien sea de manera entérica, parenteral, de manera ventajosa, intravenosamente, por ejemplo, como una suspensión o en solución acuosa. La dosificación *in vitro* puede estar en el rango entre concentraciones 10^{-3} molar y 10^{-9} molar aproximadamente. Una cantidad terapéuticamente efectiva *in vivo* puede estar en el rango dependiendo de la ruta de administración, entre 0,1-500 mg/kg aproximadamente, o entre 1-100 mg/kg aproximadamente.

30 Una forma de la presente invención puede administrarse bien sea simultáneamente con, o antes de o después de, uno o más agentes terapéuticos. Una forma de la presente invención puede administrarse de manera separada, mediante la misma o diferente ruta de administración, o juntos en la misma composición farmacéutica como los otros agentes.

35 En una realización, la invención proporciona un producto que comprende una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por la actividad de las enzimas PI3K. Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y los otros agentes terapéuticos juntos en la misma composición farmacéutica, o una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y los otros agentes terapéuticos en forma separada, por ejemplo, en forma de un kit.

45 En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y otros agente o agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describió anteriormente.

50 En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona. En una realización, el kit comprende medios para retener de manera separada dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida, o envase dividido en aluminio. Un ejemplo de tal kit es un envase de burbujas, como el que típicamente se utiliza para envasar comprimidos, cápsulas y similares.

55 El kit de la presente invención puede utilizarse para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas entre sí. Para ayudar en el cumplimiento terapéutico, el kit de la presente invención típicamente comprende pautas para administración. En las terapias de combinación de la invención, la forma de la

invención y el otro agente terapéutico pueden fabricarse y/o formularse por los mismos o diferentes fabricantes. Además, la forma de la invención y el otro terapéutico serán llevados juntos en una terapia de combinación: (i) antes de entregar el producto de combinación a los médicos (por ejemplo en el caso de un kit que comprende la forma de la invención y el otro agente terapéutico); (ii) por los médicos mismos (o bajo la pauta del médico) poco antes de administración; (iii) en los pacientes mismos, *por ejemplo* durante administración secuencial de la forma de la invención y el otro agente terapéutico.

La invención también proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para utilizar como un producto farmacéutico.

- 10 Por consiguiente, la invención proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para tratar una enfermedad. La invención también proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las enzimas PI3K, en donde el medicamento se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K, en donde el medicamento se administra con una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona.
- 15
- 20 La invención también proporciona una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para uso en un método de tratamiento. La invención también proporciona una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para uso en un método para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K, en donde la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona se prepara para la administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para uso en un método para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K, en donde el otro agente terapéutico se prepara para la administración con una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona. La invención también proporciona una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para uso en un método para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K en donde la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para uso en un método para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K en donde el otro agente terapéutico se administra con una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona.
- 25
- 30
- 35
- 40 La invención también proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para tratar una enfermedad. La invención también proporciona el uso de una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o afección mediada por la actividad de las Enzimas PI3K, en donde el paciente ha sido tratado previamente (por ejemplo, dentro de 24 horas) con una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona.
- 45
- 50 La forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona se puede administrar como el ingrediente activo adicional o en conjunto con, por ejemplo como un adyuvante de, otros fármacos por ejemplo agentes inmunosupresivos o inmunomoduladores u otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo para el tratamiento y la prevención de rechazo agudo o crónico de alo-o xenoinjertos o trastornos inflamatorios o autoinmunes, o un agente quimioterapéutico, por ejemplo un agente antiproliferativo celular maligno. Por ejemplo, la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona se puede utilizar en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A o FK 506; un inhibidor de mTOR, por ejemplo rapamicina, 40-O-(2-hidroxietyl)rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573, Tafa-93, biolimus-7 o biolimus-9; una ascomicina que tiene propiedades inmunosupresoras, por ejemplo ABT-281, ASM981, etc.; corticosteroides; ciclofosfamida; azatiopreno; metotrexato;
- 55
- 60

leflunomida; mizoribina; ácido o sal micofenólico; mofetil de micofenolato; 15-deoxispergualina o un homólogo inmunosupresivo, análogo o derivado del mismo; un inhibidor de PKC, por ejemplo como se divulga en WO 02/38561 o WO 03/82859, por ejemplo el compuesto del Ejemplo 56 o 70; un inhibidor de quinasa JAK3, por ejemplo N-bencil-3,4-dihidroxi-benciliden-cianoacetamida α -ciano-(3,4-dihidroxi)N-bencilcinamamida (Tirfostin AG 490), prodigiosin 25-C (PNU156804), [4-(4'-hidroxifenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] (WHI-P131), [4-(3'-bromo-4'-hidroxilfenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] (WHI-P154), [4-(3',5'-dibromo-4'-hidroxilfenil)-amino-6,7-dimetoxiquinazolina] WHI-P97, KRX-211, 3-((3R,4R)-4-metil-3-[metil-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-il)-amino]-piperidin-1-il)-3-oxo-propionitrilo, en forma libre o una forma de sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo mono-citrato (también llamado CP-690,550), o un compuesto como se divulga en WO 04/052359 o WO 05/066156; anticuerpos monoclonales inmunosupresivos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales a receptores de leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD25, CD28, CD40, CD45, CD52, CD58, CD80, CD86 o sus ligandos; otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo una molécula de unión recombinante que tiene al menos una porción del dominio extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo, por ejemplo un porción al menos extracelular de CTLA4 o un mutante del mismo unido a secuencia proteica no-CTLA4, por ejemplo CTLA4Ig (por ejemplo ATCC designada 68629) o un mutante del mismo, por ejemplo LEA29Y; inhibidores moleculares de adhesión, por ejemplo LFA-1 antagonistas, ICAM-1 o-3 antagonistas, VCAM-4 antagonistas o VLA-4 antagonistas; o antihistaminas; o antitusivos, o un agente broncodilatatorio; o un bloqueador de receptor de angiotensina; o un agente antiinfeccioso.

Donde la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona se administra en conjunto con otra terapia inmunosupresiva/inmunomodulatoria, antiinflamatoria, quimioterapéutica o anti-infecciosa, la dosis del inmunosupresor, inmunomodulatorio, antiinflamatorio, quimioterapéutico o compuesto antiinfeccioso coadministrado variará desde luego dependiendo del tipo de cofármaco empleado, por ejemplo si es un esteroide o un inhibidor de calcineurina, en el fármaco específico empleado, en la afección tratada y así sucesivamente.

Una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona también puede utilizarse en combinación con otros agentes terapéuticos, especialmente otros agentes antiproliferativos. Tales agentes antiproliferativos incluyen pero no se limitan a inhibidores de aromatasas, antiestrogenos, inhibidores de la topoisomerasa I, inhibidores de la topoisomerasa II, agentes activos de microtubulos, agentes alquilantes, inhibidores de la histona deacetilasa, compuestos que inducen procesos de diferenciación celular, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores MMP, inhibidores mTOR, antimetabolitos antineoplásicos, compuestos de platino, compuestos que direccionan/disminuyen una actividad de la quinasa proteica o lipídica y compuestos antiangiogénicos adicionales, compuestos los cuales direccionan, disminuyen o inhiben la actividad de una fosfatasa proteica o lipídica, agonistas de gonadorelina, antiandrógenos, inhibidores de la metionina aminopeptidasa, bisfosfonatos, modificadores de respuesta biológica, anticuerpos antiproliferativos, inhibidores de heparanasa, inhibidores de isoformas oncogénicas Ras, inhibidores de telomerasa, inhibidores de la proteasoma, agentes utilizados en el tratamiento de malignidades hematológicas, compuestos que direccionan, disminuyen o inhiben la actividad de Flt-3, inhibidores de Hsp90, temozolomida (TEMODAL®) y leucovorina.

La frase "inhibidor de la aromatasas" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe la producción de estrógenos, es decir, la conversión de los sustratos androstenediona y testosterona a estrona y estradiol, respectivamente. El término incluye, pero no se limita a esteroides, especialmente atamestano, exemestano y formestano y, en particular, no esteroides, especialmente aminoglutetimida, rogletimida, piridoglutetimida, trilostano, testolactona, ketoconazol, vorozol, fadrozol, anastrozol y letrozol. El exemestano se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial AROMASIN. El formestano se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial LENTARON. El fadrozol se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial AFEMA. El anastrozol se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial ARIMIDEX. El letrozol se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada FEMARA o FEMAR. La aminoglutetimida se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial ORIMETEN. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un inhibidor de la aromatasas es particularmente útil para el tratamiento de tumores con receptores hormonales positivos, por ejemplo, tumores de mama.

El término "antiestrógeno" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que antagoniza el efecto de los estrógenos en el nivel de receptor de estrógeno. El término incluye, pero no se limita a tamoxifeno, fulvestrant, raloxifeno y clorhidrato de raloxifeno. El tamoxifeno puede ser administrado, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial NOLVADEX. El clorhidrato de raloxifeno se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial EVISTA. El fulvestrant se puede formular como se describe en la patente de EE.UU. 4.659.516 o se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial FASLODEX. Una combinación de la invención que comprende un agente quimioterapéutico que es un antiestrógeno es particularmente útil para el tratamiento de tumores con receptores de estrógenos positivos, por ejemplo, tumores de mama.

El término "antiandrógeno" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que es capaz de inhibir los efectos biológicos de las hormonas androgénicas e incluye, pero no se limita a, bicalutamida (CASODEX), que se puede formular, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 4.636.505.

El término "agonista de gonadorelina" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a abarelix, goserelina y acetato de goserelina. La goserelina se describe en la patente de EE.UU. 4.100.274 y se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial ZOLADEX. Abarelix se puede formular, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 5.843.901. La frase "inhibidor de la topoisomerasa I" tal como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a toptotecan, gimitecan, irinotecan, camptotecina y sus análogos, 9-nitrocamptotecina y el conjugado de camptotecina macromolecular PNU-166148 (compuesto A1 en el documento WO99/17804). El irinotecan puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial CAMPTOSAR. El toptotecan puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial HYCAMTIN.

La frase "inhibidor de la topoisomerasa II" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a las antraciclinas tales como doxorubicina (incluyendo formulación liposómica, por ejemplo CAELYX), daunorubicina, epirubicina, idarubicina y nemorubicina, las antraquinonas mitoxantrona y losoxantrona, y las podofilotoxinas etopósido y tenipósido. El etopósido puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ETOPOPHOS. El tenipósido puede ser administrado, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca VM 26-bRISTOL. La doxorubicina puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ADRIBLASTIN o ADRIAMYCIN. La epirubicina se puede administrar, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial FARMORUBICIN. La idarubicina puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ZAVEDOS. La mitoxantrona se puede administrar, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial NOVANTRON.

La frase "agente activo sobre microtúbulos" se refiere a agentes estabilizantes de microtúbulos, desestabilizadores de microtúbulos e inhibidores de polimerización de microtúbulos que incluyen, pero no se limitan a taxanos, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel, alcaloides de la vinca, por ejemplo, vinblastina, especialmente sulfato de vinblastina, vincristina especialmente sulfato de vincristina y vinorelbina, discodermolidas, colchicina y epotilonas y sus derivados, por ejemplo, epotilona B o D o derivados de los mismos. El paclitaxel puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo TAXOL. El docetaxel se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial TAXOTERE. El sulfato de vinblastina puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial VINBLASTIN R.P. El sulfato de vincristina puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial FARMISTIN. La discodermolida puede obtenerse, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 5.010.099. También se incluyen los derivados de epotilona que se divulgan en los documentos WO 98/10121, la patente de EE.UU. 6.194.181, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 y WO 00/31247. Son especialmente preferidos Epotilona A y/o B.

La frase "compuesto alquilante" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan o nitrosourea (BCNU o Gliadel). La ciclofosfamida se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial CICLOSTIN. La ifosfamida se puede administrar, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial HOLOXAN.

La frase "inhibidores de histona desacetilasa" o "inhibidores de HDAC" se refiere a compuestos que inhiben la histona desacetilasa y que poseen actividad antiproliferativa. Esto incluye compuestos descritos en el documento WO 02/22577, especialmente *N*-hidroxi-3-[4-[[2-(2-hidroxi-1H-indol-3-il)etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida, *N*-hidroxi-3-[4-[[2-(2-metil-1H-indol-3-il)-etil]-amino]metil]fenil]-2*E*-2-propenamida y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Además, incluye especialmente ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA).

La frase "antimetabolito antineoplásico" incluye, pero no se limita a, 5-Fluorouracilo o 5-FU, capecitabina, gemcitabina, agentes desmetilantes de ADN, tales como 5-azacitidina y decitabina, metotrexato y edatrexato, y antagonistas del ácido fólico tales como pemetrexed. La capecitabina puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca registrada XELODA. La gemcitabina puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial GEMZAR. También se incluye el anticuerpo monoclonal trastuzumab que puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial HERCEPTIN.

La frase "compuesto de platino" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, carboplatino, cis-platino, cisplatino y oxaliplatino. El carboplatino puede administrarse, por ejemplo en forma como se comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial CARBOPLAT. El oxaliplatino puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial ELOXATIN. La frase "compuestos que actúan sobre/disminuyen una actividad proteica o de quinasa lipídica; o una actividad proteica o de fosfatasa lipídica; o "compuestos anti-angiogénicos adicionales" como se usan en el presente documento incluye, pero no se limita a inhibidores de la proteína tirosina quinasa y/o serina y/o treonina quinasa o inhibidores de la quinasa lipídica, por ejemplo,

a) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de factor de crecimiento derivados a partir de plaquetas (PDGFR), tal como compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de PDGFR, especialmente compuestos que inhiben el receptor de PDGF, por ejemplo, un derivado de *N*-fenil-2-pirimidina-amina, por ejemplo imatinib, SU101, SU6668 y GFB-111;

b) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR);

- c) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad del receptor I del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-IR), tales como los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de IGF-IR, especialmente compuestos que inhiben el receptor de IGF-IR, tales como los compuestos dados a conocer en el documento WO 02/092599;
- 5 d) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de la familia tirosina quinasa del receptor Trk;
- e) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de la familia receptor Axl de la tirosina quinasa;
- f) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad del receptor de c-Met;
- g) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad del receptor de tirosina quinasa Kit/SCFR, por ejemplo, imatinib;
- 10 h) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de tirosina quinasa C-kit-(parte de la familia PDGFR), tales como compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la familia de receptores de la tirosina quinasa c-Kit, especialmente compuestos que inhiben el receptor c-Kit, por ejemplo, imatinib;
- 15 i) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de miembros de la familia c-Abl, sus productos de fusión génica, por ejemplo, BCR-Abl quinasa, tales como compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de miembros de la familia c-Abl y sus productos de fusión génica, por ejemplo, un derivado de *N*-fenil-2-pirimidina-amina, por ejemplo imatinib, PD180970, AG957, NSC 680410 o PD173955 de ParkeDavis;
- j) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de miembros de la proteína quinasa C (PKC) y la familia Raf de serina/treonina quinasa, los miembros de la MEK, SRC, JAK, FAK, PDK y miembros de la familia Ras/MAPK, o la familia de quinasa PI(3), o la familia de quinasa relacionadas con quinasa PI(3) y/o miembros de la familia de quinasa dependientes de ciclina (CDK) y son especialmente aquellos derivados de estaurosporina descritos en EE.UU. 5,093,330, por ejemplo, midostaurina; ejemplos de otros compuestos incluyen por ejemplo, UCN-01, safingol, BAY 43-9006, briostatina 1, Perifosina; Ilmofosina; RO 318220 y RO 320432; GO 6976; Isis 3521; LY333531/LY379196; compuestos de isoquinolina tales como los descritos en el documento WO 00/09495; FTIs; PD184352 (un inhibidor de PI3K);
- 20 k) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de los inhibidores de la proteína tirosina quinasa, tales como los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de los inhibidores de la proteína tirosina quinasa incluyen mesilato de imatinib (Gleevec) o tirfostina. Una tirfostina es preferentemente un compuesto de bajo peso molecular (Mr <1500), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, especialmente un compuesto seleccionado de la clase de compuestos bencilidenomalonitrilo o las clases S-arilbencenomalonitrilo o bisubstrato quinolina, más especialmente cualquier compuesto seleccionado del grupo que consta de Tirfostin A23/RG-50810; AG 99; Tirfostin AG 213; Tirfostin AG 1748; Tirfostin AG 490; Tirfostin B44; Tirfostin B44 enantiómero (+); Tirfostin AG 555, AG 494; Tirfostin AG 556, AG957 y éster adamantilo del ácido adafostina (4-((2,5-dihidroxifenil) metil] amino)-benzoico; NSC 680410, adafostina); y
- 30 l) compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico de tirosina quinasa (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 como homo- o heterodímeros) y sus mutantes, tales como compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia del receptor EGF de la tirosina quinasa, por ejemplo, el receptor EGF, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 o se unen a EGF o ligandos relacionados con EGF, y son en particular aquellos compuestos, proteínas o anticuerpos monoclonales genérica y específicamente divulgados en el documento WO 97/02266, por ejemplo, el compuesto del ejemplo 39, o en los documentos EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, EE.UU. 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034, WO 97/49688, WO 97/38983 y, especialmente, WO 96/30347 (por ejemplo el compuesto conocido como CP 358774), WO 96/33980 (por ejemplo el compuesto ZD 1839) y WO 95/03283 (por ejemplo compuesto ZM105180); por ejemplo, trastuzumab (HERCEPTIN), Cetuximab, Iressa, Tarceva, OSI-774, IC-1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 o E7.6.3, y
- 35 derivados de 7H-pirrolo-[2,3-d]pirimidina que se describen en el documento WO 03/01354. Los compuestos antiangiogénicos adicionales incluyen compuestos que tienen otro mecanismo para su actividad, por ejemplo, no relacionados con inhibición de la quinasa proteica o lipídica por ejemplo, talidomina (THALOMID) y TNP-470.
- 50 Los compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de una proteína fosfatasa lipídica son por ejemplo inhibidores de la fosfatasa 1, fosfatasa 2A, PTEN o CDC25, por ejemplo, ácido okadaico o un derivado del mismo.
- Los compuestos que inducen procesos de diferenciación celular son por ejemplo ácido retinoico, α - γ -o δ -tocoferol o α - γ -o δ -tocotrienol. El término inhibidor de la ciclooxigenasa como se usa en el presente documento incluye, pero no

está limitado a, por ejemplo, inhibidores de la Cox-2, ácido 2-arilaminofenilacético 5-alquilo-sustituido y derivados, tales como celecoxib (CELEBREX), rofecoxib (VIOXX), etoricoxib, valdecoxib o un ácido 5-alquil-2-arilaminofenilacético, por ejemplo, ácido 5-metil-2-(2'-cloro-6'-fluoroanilino)fenil-acético o lumiracoxib. La frase "bisfosfonatos", como se usa en el presente documento incluye, pero no está limitado a, ácido etridrónico, clodrónico, 5 tiludrónico, pamidrónico, alendrónico, ibandrónico, risedrónico y ácido zoledrónico. El "ácido etridrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial DIDRONEL. El "ácido clodrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca BONEFOS. El "ácido tiludrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial SKELID. El "ácido pamidrónico" puede administrarse, por ejemplo en forma como se 10 comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial AREDIA™. El "ácido alendrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial FOSAMAX. El "ácido ibandrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial BONDRANAT. El "ácido risedrónico" puede administrarse, por ejemplo, en forma como se comercializa, por ejemplo, bajo la marca comercial ACTONEL. El "ácido zoledrónico" puede administrarse, por ejemplo en forma como se 15 comercializa, por ejemplo bajo la marca comercial ZOMETA. La frase "inhibidores de mTOR" se refiere a compuestos que inhiben el objetivo mamífero de la rapamicina (mTOR) y que poseen actividad antiproliferativa tal como sirolimus (Rapamune®), everolimus (Certican™), CCI-779 y ABT578.

La frase "inhibidor de la heparanasa" como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la degradación de sulfato de heparina. El término incluye, pero no está limitado a, PI-88.

La frase "modificador de la respuesta biológica" como se usa en el presente documento se refiere a una lincocina o interferonas, por ejemplo, interferón γ .

La frase "inhibidor de las isoformas oncogénicas Ras", por ejemplo, H-Ras, K-Ras, o N-Ras, como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad oncogénica de Ras por ejemplo, un "inhibidor de la farnesil transferasa", por ejemplo, L-744.832, DK8G557 o R115777 (Zarnestra).

La frase "inhibidor de la telomerasa" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la telomerasa. Los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la telomerasa son especialmente compuestos que inhiben el receptor de telomerasa, por ejemplo, telomestatina.

La frase "inhibidor de la metionina aminopeptidasa " como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la metionina aminopeptidasa. Los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la metionina aminopeptidasa son por ejemplo, bengamida o un derivado de la misma.

La frase "inhibidor de proteasoma" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad del proteasoma. Los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de la proteasoma incluyen por ejemplo, PS-341 y MLN 341.

La frase "inhibidor de metaloproteínasa de la matriz" o "inhibidor MMP" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a inhibidores peptidomiméticos y no peptidomiméticos de colágeno, derivados de la tetraciclina, por ejemplo, el inhibidor peptidomimético de hidroxamato, batimastat y su análogo oralmente biodisponible, marimastat (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (NSC 683551) BMS-279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B o AAJ996.

La frase "agentes utilizados en el tratamiento de neoplasias hematológicas" como se usa en el presente documento incluye, pero no está limitado a, inhibidores de la tirosina quinasa tipo FMS por ejemplo, compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de los receptores de la tirosina quinasa tipo FMS (Flt-3R); interferón, 1-b-D-arabinofuransilcitosina (ara-c) y bisulfan; e inhibidores de ALK por ejemplo compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la quinasa del linfoma anaplásico. Los compuestos que actúan sobre, reducen o inhiben la actividad de receptores de la tirosina quinasa tipo FMS (Flt-3R) son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben los miembros de la familia del receptor Flt-3R quinasa, por ejemplo, PKC412, midostaurina, un derivado de estaurosporina, SU11248 y MLN518.

La frase "inhibidores de HSP90" como se usa en el presente documento incluye, pero no se limita a, compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de ATPasa intrínseca del HSP90; degradando, actuando sobre, disminuyendo o inhibiendo las proteínas cliente de Hsp90 a través de la vía de la ubiquitina proteosoma. Los compuestos que actúan sobre, disminuyen o inhiben la actividad de ATPasa intrínseca de HSP90 son especialmente compuestos, proteínas o anticuerpos que inhiben la actividad de ATPasa intrínseca de HSP90 por ejemplo, 17- 55 alilamino, 17-dimetoxigeldanamicina (17AAG), un derivado de geldanamicina; otros compuestos relacionados con geldanamicina; radicicol e inhibidores de HDAC.

El término "anticuerpos antiproliferativos" como se usa en el presente documento incluye, pero no está limitado a, trastuzumab (Herceptin™), Trastuzumab-DM1, erlotinib (Tarceva™), bevacizumab (Avastin™), Rituximab (Rituxan™), PRO64553 (anti-CD40) y anticuerpo 2C4. Por anticuerpos se entiende, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos formados a partir de al menos 2 anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Para el tratamiento de leucemia mieloide aguda (AML), la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona se puede utilizar en combinación con terapias de leucemia estándar, especialmente en combinación

con terapias utilizadas para el tratamiento de AML. En particular, la forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona se puede administrar en combinación con, por ejemplo, inhibidores de transferasa farnesilo y/u otros fármacos útiles para el tratamiento de AML, tales como Daunorubicin, Adriamicina, Ara-C, VP-16, Teniposida, Mitoxantrona, Idarubicin, Carboplatino y PKC412.

Una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona también puede utilizarse para aventajar en combinación con otros agentes terapéuticos, especialmente otros agentes antimalaria. Tales agentes antimalaria incluyen, pero no se limitan a proguanil, clorproguanilo, trimetoprim, cloroquina, mefloquina, lumefantrina, atovaquona, pirimetamina-sulfadoxina, pirimetamina-dapsona, halofantrina, quinina, quinidina, amodiaquina, amopiroquina, sulfonamidas, artemisinina, arteflene, arteméter, artesunato, primaquina, NO inhalado, L-arginina, Dipropilene triamina NONOato (donador de NO), Rosiglitzone (PPAR γ agonista), carbón activado, eritropoyetina, levamisol y pironaridina.

Una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona también puede utilizarse para aventajar en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como los usados para el tratamiento de Leishmaniasis, Tripanosomiasis, Toxoplasmosis y Neurocisticercosis. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a sulfato de cloroquina, atovaquona-proguanil, arteméterc-lumefantrina, sulfato de quinina, artesunato, quinina, doxiciclina, clindamicina, antimonio de meglumina, estibogluconato de sodio, miltefosina, ketoconazol, pentamidina, anfotericina B (AmB), AmB liposomal, paromomicina, eflornitina, nifurtimox, suramina, melarsoprol, prednisolona, benznidazol, sulfadiazina, pirimetamina, clindamicina, trimetoprim, sulfametoxazol, azitromicina, atovaquona, dexametasona, praziquantel, albendazol, beta-lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, aminoglucósidos, sulfadiazina y pirimetamina.

La estructura de los agentes activos identificados por números de código, nombres genéricos o comerciales pueden ser tomada de la edición actual del compendio estándar "The Merck Index" o desde bases de datos, por ejemplo, Patents International (por ejemplo, IMS World Publications).

Los compuestos mencionados anteriormente, que se puede utilizar en combinación con una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona, se pueden preparar y administrar como se describe en la técnica, tales como en los documentos citados anteriormente.

Una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona también puede utilizarse para aventajar en combinación con procesos terapéuticos conocidos, por ejemplo, la administración de hormonas o especialmente radiación.

Una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona puede utilizarse en particular como un radio sensibilizador, especialmente para el tratamiento de tumores que exhiben sensibilidad pobre a la radioterapia.

Por "combinación", se entiende o bien una combinación fija en una forma de unidad de dosificación, o un kit de partes para la administración combinada en donde una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y un socio de combinación se puede administrar independientemente al mismo tiempo o de manera separada entre intervalos de tiempo que permitan específicamente que los socios de combinación muestren un efecto cooperativo, por ejemplo, sinérgico, o cualquier combinación de los mismos. Los términos "coadministración" o "administración combinada" o similares como se usan en el presente documento pretenden abarcar la administración del socio de combinación seleccionado a un sujeto individual que lo necesite (por ejemplo, un paciente), y pretenden incluir los regímenes de tratamiento en los que los agentes no son necesariamente administrados por la misma vía de administración o al mismo tiempo. El término "combinación" como se usa en el presente documento significa un producto que resulta de la mezcla o combinación de más de un ingrediente activo e incluye combinaciones tanto fijas como no fijas de los ingredientes activos. La frase "combinación fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona y un socio de combinación, se administran ambos a un paciente simultáneamente en la forma de una entidad o dosis individual. La frase "combinación no fija" significa que los ingredientes activos, por ejemplo una forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona) y un socio de combinación, se administran ambos a un paciente como entidades separadas ya sea simultáneamente, concurrentemente o secuencialmente con límites de tiempo no específicos, en donde tal administración proporciona niveles terapéuticamente efectivos de los dos compuestos en el cuerpo del paciente. Este último se aplica también a la terapia cóctel, por ejemplo la administración de tres o más ingredientes activos.

Ejemplos**Detalles Experimentales:**

5 Los siguientes ejemplos tienen el propósito de ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones de la misma. Las temperaturas son dadas en grados centígrados. Si no se menciona lo contrario, todas las evaporaciones son realizadas bajo presión reducida, preferentemente entre 15 mm Hg y 100 mm Hg aproximadamente (=20-133 mbar). La estructura de los productos finales, intermedios y materiales de inicio es confirmada por métodos analíticos estándar, por ejemplo, microanálisis y características espectroscópicas, por ejemplo, MS, IR, RMN. Las abreviaturas utilizadas son las convencionales en la técnica.

10 Todos los materiales de partida, precursores de síntesis, reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, disolventes y catalizadores utilizados para sintetizar las formas de la presente invención están comercialmente disponibles o pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por alguien con habilidad común en la técnica (Houben-Weyl 4ª Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volumen 21). Además, las formas de la presente invención pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánicas conocidas por un experto en la técnica como se muestra en los siguientes ejemplos.

15 **Abreviaturas**

	ACN	acetonitrilo
	AcOH	ácido acético
	ac.	acuoso
	Boc	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
20	Boc ₂ O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
	tBu	<i>tert</i> -butilo
	tBuOH	<i>tert</i> -butanol
	BrettPhos	2-(Diciclohexilfosfino)-3,6-dimetoxi-2'-4'-6'-triiisopropil-1,1'-bifenilo
	s a	singlete amplio
25	COMU	Hexafluorofosfato de (1-Ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminooxi)dimetilamino-morfolino-carbenio
	conc.	concentrado
	d	día o días
	d	doblete
30	dd	Doblete de dobletes
	dba	dibencilidenacetona
	DCM	diclorometano
	DEA	dietilamina
	DEAD	azodicarboxilato de dietilo
35	DEAP	dietilaminopiridina
	DIPEA	diisopropiletilamina
	DMF	dimetilformamida
	DMME	dimetoximetano
	DMSO	dimetilsulfóxido
40	DPPA	Azida de difenilfosforilo
	DPPF	1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno
	EDC	Clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
	eq.	equivalente o equivalentes
	ESI	Ionización por electropulverizado
45	Et ₃ N	trietilamina
	Et ₂ O	dietiléter
	EtOAc	acetato de etilo
	EtOH	etanol
	H	Hora u horas
50	HATU	hexafluorofosfato de O-(7 azabenzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	HBTU	Hexafluorofosfato de O-(1H-benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
	HMDS	hexametildisilazano
	HOBT	1-hidroxi-benzotriazol
	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
55	IPA	isopropanol
	CLEM	Cromatografía líquida con espectrometría de masas
	mCPBA	Ácido meta-cloroperoxibenzoico
	MeOH	metanol
	m	múltiplo
60	min	minuto o minutos

	EM	espectrometría de masas
	mw	microondas
	RMN	espectrometría de resonancia magnética nuclear
	NaOtBu	terc-butóxido sódico
5	NP	Fase normal
	OBD	densidad de lecho óptima
	Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibencilidenoacetona)dipaladio
	PL-HCO ₃ MP SPE	Cartucho de bicarbonato con soporte polimérico para eliminación de ácido
	prep.	preparativa
10	PPh ₃	trifenilfosfina
	Q	cuarteto
	Rac-binAP	2,2'-bis(di- <i>p</i> tolilfosfino)-1,1'-binaftilo racémico
	RP	Fase inversa
	Rt	tiempo de retención
15	ta	temperatura ambiente
	RuPhos	2-diciclohexilfosfino-2',6'-di-isopropoxi-1,1'-bifenilo
	sat.	saturado
	SCX-2	Poliestireno macroporoso del ácido sulfónico con soporte polimérico
	sol.	solución
20	t	tripleto
	TBM	Éter terc-butilmetílico
	TBA	Ffluoruro de tetrabutilamonio
	TBDMSCI	terc-butildimetilsililcloruro
	Tetrametil-t-butilo -Xphos	2-di-t-butilfosfino-3,4,5,6-tetrametil-2',4',6'-trisisopropilbifenilo
25	TFA	ácido trifluoroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TLC	cromatografía en capa fina
	UPLC	Cromatografía líquida de ultra rendimiento
	XPhos	2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropilbifenilo
30	Pd[RuPhos]	(2-diciclohexilfosfino-2',4',6'-trisisopropil-1,1'-bifenil)(2-(2-aminoetil)fenil)paladio(II)

El equipo de microondas utilizado es un Biotage Initiator®

Todos los compuestos se nombraron utilizando AutoNom.

Información de Cromatografía General

Método CLEM M1 (Rt_{M1})

35	Dimensiones de columna HPLC:	2,1 x 50 mm
	Tipo de Columna HPLC:	Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm
	Eluyente HPLC:	A) agua + 0,05 % en vol ácido fórmico + 3,75 mM acetato de amonio B) ACN + 0,04 % en vol ácido fórmico
	Gradiente HPLC:	2-98 % B en 1,4 min, 98 % B 0,45 min, flujo = 1,2 ml/min
40	Temperatura de columna HPLC:	50 °C

Método CLEM M2 (Rt_{M2})

	Dimensiones de columna HPLC:	2,1 x 30 mm
	Tipo de Columna HPLC:	Ascentis Express C18, 2,7 µm
45	Eluyente HPLC:	A) agua + 0,05 % en vol ácido fórmico + 3,75 mM acetato de amonio; B) ACN + 0,04 % en vol ácido fórmico
	Gradiente HPLC:	2-98 % B en 1,4 min, 0,75 min 98 % B, flujo = 1,2 ml/min
	Temperatura de columna HPLC:	50 °C

Método CLEM M3 (Rt_{M3})

	Dimensiones de columna HPLC:	2,1 x 30 mm
	Tipo de Columna HPLC:	Ascentis Express C18, 2,7 µm
50	Eluyente HPLC:	A) agua + 0,05 % en vol ácido fórmico + 3,75 mM acetato de amonio; B) ACN + 0,04 % en vol ácido fórmico
	Gradiente HPLC:	2-98 % B en 8,5 min, 1 min 98 % B, flujo = 1,2 ml/min
	Temperatura de columna HPLC:	50 °C

Método CLEM M4 (Rt_{M4})

55	Dimensiones de columna HPLC:	4,6 x 50 mm
	Tipo de Columna HPLC:	SunFire C18, 5 µm
	Eluyente HPLC:	A) agua + 0,1 % en vol TFA; B) ACN + 0,1 % en vol TFA

ES 2 643 902 T3

Gradiente HPLC: 5-100 % B en 8,0 min B, flujo = 2 ml/min
 Temperatura de columna HPLC: 40 °C

Método CLEM M5 (Rt_{M5})

5 Dimensiones de columna HPLC: 0,46x25 cm
 Tipo de Columna HPLC: Chiralcel OJ-H (1189)
 Eluyente HPLC: EtOH/MeOH 60:40
 Gradiente HPLC: isocrático, flujo=0,5 ml/min
 Detector: UV 220 nm

Método CLEM M6 (Rt_{M6})

10 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % TFA, B) ACN + 0,04 % TFA
 Gradiente HPLC: 2-98 % B en 1,4 min, 0,75 min 98 % B, flujo = 1,2 ml/min
 Temperatura de columna HPLC: 50 °C

Método CLEM M7 (Rt_{M7})

15 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % TFA, B) ACN + 0,04 % TFA
 Gradiente HPLC: 10-95 % B en 3,0 min, 1 min 95 % B, flujo = 1,2 ml/min
 20 Temperatura de columna HPLC: 50 °C

Método CLEM M8 (Rt_{M8})

Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 25 Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % ácido fórmico + acetato de amonio 3,75 mM, B) acetonitrilo +0,04 % ácido fórmico
 Gradiente HPLC: 10-95 % B en 3,0 min, flujo = 1,2 ml/min

Método CLEM M9 (Rt_{M9})

Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 30 Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % ácido fórmico + acetato de amonio 3,75 mM, B) acetonitrilo +0,04 % ácido fórmico
 Gradiente HPLC: 10 % B desde 0,0 a 0,5 min luego dese 0,5 min a 3,0 min
 gradiente 10-95 % B, flujo = 1,2 ml/min

Método CLEM M10 (Rt_{M10})

35 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 50 mm
 Tipo de Columna HPLC: Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm
 Eluyente HPLC: A) agua + 0,1 % en vol ácido fórmico, B) acetonitrilo
 Gradiente HPLC: 20-25 % B en 1,00 min, luego 25-95 % B en 3,20 min, luego 95-100 % B en 0,10 min, luego 100 % durante 0,20 min, flujo = 0,7 ml/min

Método CLEM M11 (Rt_{M11})

40 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 50 mm
 Tipo de Columna HPLC: Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm
 Eluyente HPLC: A) agua + 0,1 % en vol ácido fórmico, B) acetonitrilo
 45 Gradiente HPLC: 5-10 % B en 1,00 min, luego 10-90 % B en 3,00 min, luego 90-100 % B en 0,10 min, luego 100 % durante 0,40 min, flujo = 0,7 ml/min

Método CLEM M12 (Rt_{M12})

Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 Eluyente HPLC: A) agua + 0,1 % en vol TFA, B) acetonitrilo
 50 Gradiente HPLC: 10-95 % B durante 1,7 min y 1,2 ml/min como flujo de disolvente y luego 95 5 B durante 0,7 min, flujo = 1,4 ml/min.

Método CLEM M13 (Rt_{M13})

Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
 Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
 55 Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % ácido fórmico + acetato de amonio 3,75 mM, B)

ES 2 643 902 T3

Gradiente HPLC: acetonitrilo +0,04 % ácido fórmico
10-95 % B en 3,7 min, flujo = 1,2 ml/min

Método CLEM M14 (Rt_{M14})

5 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 30 mm
Tipo de Columna HPLC: Ascentis Express C18, 2,7 µm
Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % ácido fórmico + acetato de amonio 3,75 mM, B) acetonitrilo +0,04 % ácido fórmico
Gradiente HPLC: 10-95 % B en 1,5 min, 1 min 95 % B, flujo = 1,2 ml/min

Método CLEM M15 (Rt_{M15})

10 Dimensiones de columna HPLC: 0,46x25 cm
Tipo de Columna HPLC: Chiralcel OD-H (1194)
Eluyente HPLC: Hexano/EtOH 50:50 + 0,05 % DEA
Gradiente HPLC: isocrático, flujo=0,5 ml/min
Detector: UV 220 nm

Método CLEM M16 (Rt_{M16})

15 Dimensiones de columna HPLC: 2,1 x 50 mm
Tipo de Columna HPLC: Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm
Eluyente HPLC: A) agua + 0,05 % en vol ácido fórmico + 3,75 mM acetato de amonio B) ACN + 0,04 % en vol ácido fórmico
20 Gradiente HPLC: 5-98 % B en 1,4 min, 98 % B 0,4 min, flujo = 1,0 ml/min
Temperatura de columna HPLC: 60 °C

Difracción de rayos X en polvo

Instrumentación:

Método X1

25 Instrumento: Bruker D8 GADDS Discover
Irradiación: CuKα (40 kV, 40 mA)
Detector: Detector de área HI-STAR
Intervalo de barrido: 6°-39° (valor 2 teta)

Determinación de Punto de Fusión

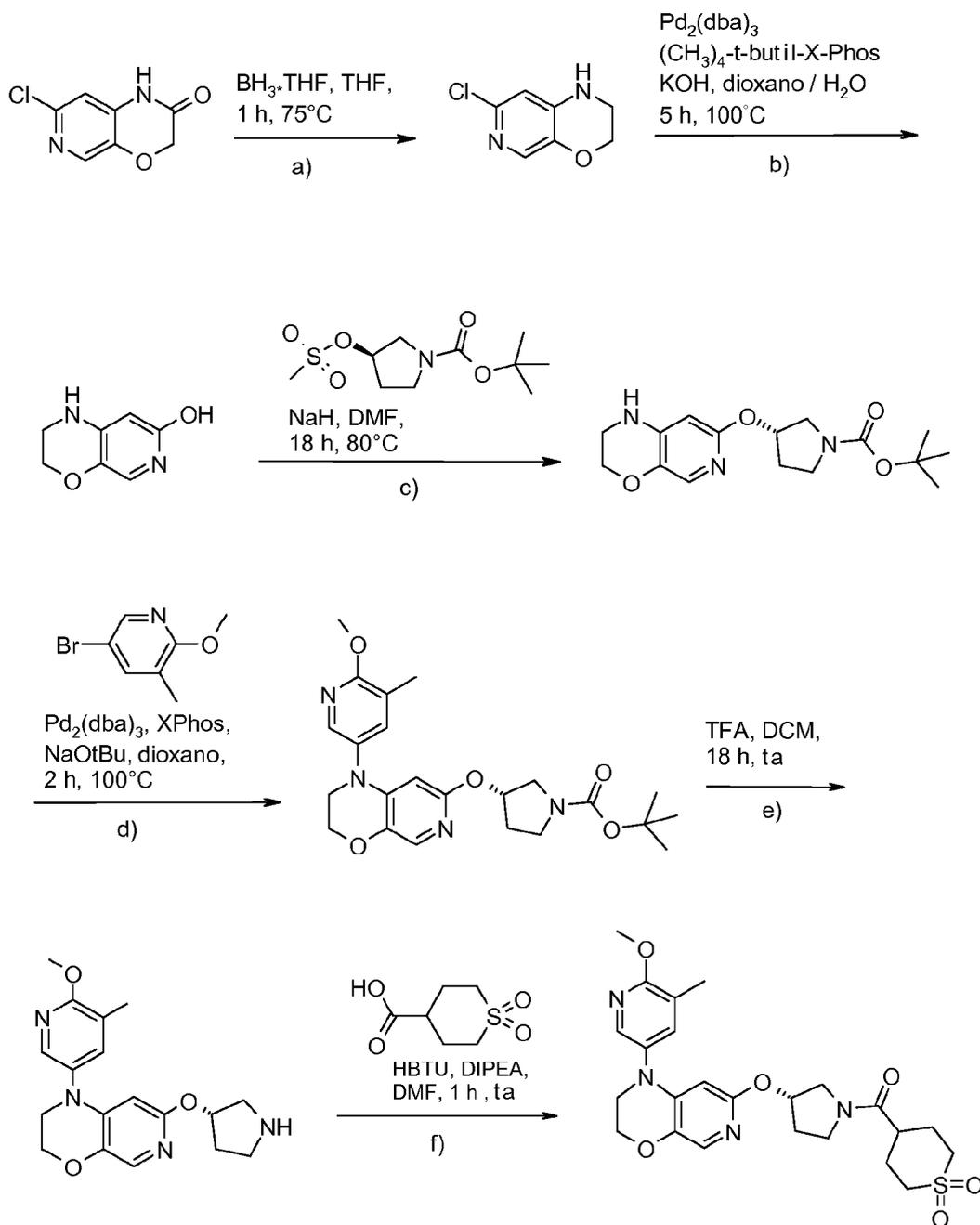
30 El punto de fusión se determinó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). DSC fue como se registró en un TA Instruments DSC Q2000 usando una velocidad de calentamiento de 10 ° C/min. Una muestra de 0.6 mg se pesó en el recipiente de aluminio estándar (recipiente + tapa, TA 900786.901, 900779.901). El instrumento se hizo funcionar utilizando el software Thermal Advantage Q-Series V.2.6.0.367 y el software Thermal Advantage V4.6.9. Los eventos térmicos se caracterizaron mediante análisis universal V4.3A Build 4.3.0.6. Las muestras se midieron contra un recipiente de muestras sin orificio de ajuste. La muestra se trató según el siguiente protocolo:

35

Etapa 1: EQUILIBRADO A 0°C

Etapa 2: Rampa de 10 °C/min hasta 300 °C

Ejemplo F1: (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b]-[1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona



a) 7-Cloro-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazina

- 5 Una solución de 7-cloro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-2-ona (CAS registro 928118-43-8) (3,70 g, 20 mmol) en THF (63 ml) se trató con $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (1M en THF, 47 ml, 47 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 75°C durante 1 h, después se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó con metanol (24 ml, 600 mmol). La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se absorbió con EtOAc y se lavó con solución acuosa saturada NaHCO_3 . La capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto del título como un sólido de color amarillo pálido (3,3 g, rendimiento del 96 %).
- 10 UPLC $\text{RT}_{\text{M1}} = 0,47$ min; ESIMS: 171 [(M+H)+].

^1H RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7,53 (s, 1H), 7,11 (s a, 1H), 6,47 (s, 1H), 4,09 (t, 2H), 3,17-3,38 (m, 2H).

b) 2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-ol

Una mezcla de 7-cloro-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazina (1,08 g, 6,33 mmol), solución acuosa KOH (1,07 g, 19 mmoles de KOH en 5,4 ml de agua), 2-di-t-butilfosfino-3, 4,5,6-tetrametil-2',4',6-tri-i-propilbifenil 98 % (0,30 g, 0,63 mmol) y Pd₂(dba)₃ (0,29 g, 0,32 mmol) en dioxano (32,5 ml) se desgasificó tres veces con nitrógeno, se selló el tubo y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de Hyflo, se enjuago con EtOAc y metanol. Los filtrados se concentraron y el compuesto del título se obtuvo tras la cromatografía ultra-rápida en gel de sílice (DCM/MeOH, 98:2 a 75:25) como un residuo de color naranja (660 mg, rendimiento del 69 %)

UPLC RT_{M1} = 0,34 min; ESIMS: 153 [(M+H)+].

¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10,33 (s a, 1H), 7,03 (s a, 1H), 6,71 (s, 1H), 5,15 (s, 1H), 3,95 (t, 2H), 3,25 (m, 2H).

c) éster terc-butílico del ácido (S)-3-(2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi)-pirrolidin-1-carboxilato de terc-butilo

Una solución seca de 2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-ol (0,66 g, 4,34 mmol) y éster terc-butílico del ácido (R)-3-metanosulfonilo-pirrolidin-1-carboxílico (CAS registro 127423-61-4) (1,73 g, 6,51 mmol) en DMF (40 ml) se trató con hidruro de sodio (60 % en aceite mineral, 0,21 g, 8,68 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 18 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con TBME y se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró, se concentró y el compuesto del título se obtuvo tras la cromatografía ultra-rápida en gel de sílice (ciclohexano/EtOAc, 95:5 a 30:70) como un aceite amarillo (1,035 g, 75 % de pureza, 56 % de rendimiento).

UPLC RTM1 = 0,65 min; ESIMS: 322 [(M + H) +].

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,54 (s, 1H), 5,86 (s, 1H), 5,42 (s a, 1H), 4,25-4,41 (m, 1H), 4,19 (t, 2H), 3,38-3,66 (m, 6H), 2,00-2,18 (m, 2H), 1,46 (d, 9H).

d) éster terc-butílico del ácido(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-carboxílico

Éster de terc-butilo del ácido (S)-3-(2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi)-pirrolidin-1-carboxílico (254 mg, 0,79 mmol), 5-bromo-2-metoxi-3-metilpiridina (CAS registro 760207-87-2) (208 mg, 1,03 mmol), XPhos (30 mg, 0,06 mmoles), y NaOtBu (167 mg, 1,74 mmol) en dioxano (6 ml) se desgasificó con argón durante 5 min, luego se añadió Pd₂(dba)₃ (29 mg, 0,03 mmol). El tubo se llenó con argón, sellado y la mezcla de reacción se agitó a 100 °C durante 2 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtró a través de Hyflo, se enjuago con EtOAc y los filtrados se lavaron con solución acuosa saturada de NaHCO₃. La capa acuosa se volvió a extraer dos veces con EtOAc, las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron, se concentraron y el compuesto del título se obtuvo tras la cromatografía ultra-rápida en gel de sílice (heptano/EtOAc, 100:0 a 50:50) como una goma clara (274 mg, rendimiento del 78 %) UPLC RTM1 = 1,20 min; ESIMS: 443 [(M+H)+].

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,93 (d, 1H), 7,61 (s a, 1H), 7,30-7,35 (m, 1H), 5,71 (s, 1H), 5,34-5,46 (m, 1H), 4,31 (s a, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,68 (t, 2H), 3,34-3,62 (m, 4H), 2,23 (s, 3H), 2,1-2,9 (m, 2H), 1,44 (s, 9H).

e) 1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-7-((S)-pirrolidin-3-iloxi)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazina

Una solución de éster terc-butílico del ácido (S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]pirrolidin-1-carboxílico (364 mg, 0,82 mmol) en DCM (6 ml) se trató con TFA (0,63 ml, 8,23 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h, después se inactivó con solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrajo con DCM. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto del título como un aceite de color rojo, que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional (313mg, 90 % de pureza, rendimiento cuantitativo).

UPLC RTM1 = 0,65 min; ESIMS: 343 [(M+H)+].

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,93 (d, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,32 (d, 1H), 5,70 (s, 1H), 5,26-5,36 (m, 1H), 4,31 (t, 2H), 3,99 (s, 3H), 3,67 (t, 2H), 2,95-3,15 (m, 3H), 2,81-2,92 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 1,98-2,10 (m, 1H), 1,79-1,90 (m, 1H).

f) (1,1-dioxo-hexahidro-1λ⁶-tiopiran-4-il)-((S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il)-metanona

Una solución de ácido 1,1-dioxo-hexahidro-1-λ⁶-tiopiran-4-carboxílico (CAS 64096-87-3 registro) (106 mg, 0,59 mmol) en DMF (4 ml) se trató con HBTU (225 mg, 0,59 mmol) y DIPEA (0,24 ml, 1,37 mmol). La solución de color naranja resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 min, luego se añadió una solución de 1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-7-((S)-pirrolidin-3-iloxi)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazina (156 mg, 0,46 mmol) en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, después se concentró a presión reducida y el residuo se absorbió con DCM y se lavó con solución acuosa saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se secó haciéndola pasar a través de un cartucho de separación de fases, se concentró y el compuesto del título se obtuvo después de la cromatografía SFC (columna DEAP (250 mm x 30 mm, 60A, 5 μm) Princeton, gradiente de 11-

16 % de metanol en CO₂ supercrítico en 6 min) como un sólido ligeramente coloreado (112 mg, rendimiento del 49 %).

UPLC RT_{M1} = 0,81 min; ESIMS: 503 [(M+H)+].

5 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8,01 (s, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,52 (d, 1H), 5,52 (d, 1H), 5,24-5,43 (m, 1H), 4,26 (s a, 2H), 3,89 (s, 3H), 3,59-3,79 (m, 3H), 3,41-3,56 (m, 2H), 3,21-3,39 (m, 1H), 2,98-3,21 (m, 4H), 2,67-2,83 (m, 1H), 1,84-2,20 (m, 9H).

¹H RMN (600 MHz, DMSO-d₆): δ 8,01 (s, 1H), 7,63-7,59 (m, 1H), 7,55-7,51 (m, 1H), 5,55-5,51 (m, 1H), 5,43-5,24 (m, 1H), 4,29-4,22 (m, 2H), 3,90 (s, 3H), 3,80-3,60 (m, 2H), 3,56-3,37 (m, 3H), 3,28-2,99 (m, 5H), 2,89-2,66 (m, 1H), 2,19 a 2,9 (m, 4H), 2,08-1,98 (m, 2H), 1,98-1,86 (m, 3H).

10 **Cristalización del Ejemplo F1 por calentamiento y enfriamiento en isopropanol/éter dietílico**

15 Se suspendieron 474 mg de Ejemplo F1 amorfo en 1,4 ml de isopropanol. La mezcla se calentó a 70 °C y se agitó a 70 °C para permitir la disolución completa del Ejemplo F1. La solución se enfrió a temperatura ambiente, se formó un residuo de pegamento. Se añadieron 2 ml de éter dietílico y la suspensión se agitó durante 48 h. Se formó una suspensión de color blanco. La suspensión se filtró y el sólido se secó a 40 °C, 15 mbar. Se obtuvo un polvo fino, blanco. El material sólo contiene disolvente residual leve (<0,5 %). Se obtuvo una forma cristalina anhidra del Ejemplo F1 con un inicio de fusión 148,77 °C.

Lista de los picos 2-Teta más significativos a partir del patrón de difracción de polvo de rayos X con tolerancias de ± 0,5 de la forma anhidra del Ejemplo F1 (Método M1) (incluyendo los picos bajos/débiles para información). Nota: Esta lista de picos no es exhaustiva, sino que son solamente "entre otros".

2-teta en grados	Intensidad
9,1	Baja
10,2	Media
11,9	Media
13,0	Baja
17,1	Fuerte
17,7	Media, sin resolver
18,7	Media
20,3	Media, sin resolver
20,8	Media, sin resolver
26,0	Media/baja
26,7	Media
23,2	Media/baja
24,1	Media/baja
24,8	Media/baja
29,3	Media/baja
27,4	Media/baja
21,4	Media/baja

20

Evaluación Biológica

La actividad de un compuesto puede evaluarse mediante los siguientes métodos *in vitro* & *in vivo*.

Ensayos biológicos

1 Determinación de la inhibición enzimática de la isoforma PI3K alfa y PI3K delta

25 **1.1 Prueba de la actividad lípido quinasa**

La eficacia de los compuestos como inhibidores de la PI3 quinasa se puede demostrar como sigue:

La reacción de la quinasa se lleva a cabo en un volumen final de 50 µl en la mitad de placa COSTAR de 96 pocillos.

ES 2 643 902 T3

Las concentraciones finales de ATP y fosfatidil inositol en el ensayo son de 5 μM y 6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. La reacción se inició mediante la adición de la PI3-quinasa, por ejemplo, la PI3-quinasa δ .

p110 δ . Los componentes del ensayo se añaden a cada pocillo de la siguiente manera:

- 10 μl del compuesto de ensayo en DMSO al 5 % por cada pocillo en las columnas 2-1.
- 5
- La actividad total se determina mediante la adición de 10 μl de DMSO al 5 % vol/vol en los primeros 4 pocillos de la columna 1 y los últimos 4 pocillos de la columna 12.
 - El ruido de fondo se determina mediante la adición de 10 μM del compuesto de control para los últimos 4 pocillos de la columna 1 y los 4 primeros pocillos de la columna 12.
 - Se preparan 2 ml de la "mezcla de Ensayo" por placa:
- 10
- 1,912 ml de amortiguador de ensayo HEPES
 - 8,33 μl de una solución madre de ATP 3 mM dando una concentración final de 5 μM por cada pocillo
 - 1 μl de [^{33}P]ATP dando en el dato de actividad 0,05 μCi por cada pocillo
 - 30 μl de una solución madre de PI de 1 mg/ml dando una concentración final de 6 $\mu\text{g/ml}$ por cada pocillo
 - 5 μl de una solución madre de MgCl_2 de 1 M dando una concentración final de 1 mM por cada pocillo
- 15
- se añaden 20 μl de la mezcla de ensayo a cada pocillo.
 - se preparan 2 ml de la "mezcla de ensayo" por placa (x * μl de quinasa PI3 p110 β en 2 ml de tampón de quinasa). La "mezcla de la enzima" se mantiene en hielo durante su adición a las placas de ensayo.
 - se añaden 20 μl de la "mezcla de la enzima" a cada pocillo para iniciar la reacción.
 - La placa se incuba a temperatura ambiente durante 90 minutos.
- 20
- La reacción se termina mediante la adición de 50 μl de una suspensión de esferas de WGA-SPA (cuentas de ensayo de centelleo de proximidad recubiertas con aglutinina de germen de trigo) por cada pocillo.
 - La placa de ensayo se sella usando TopSeal-S (sellado térmico para microplacas de poliestireno, PerkinElmer LAS [Deutschland] GmbH, Rodgau, Alemania) y se incubó a temperatura ambiente durante al menos 60 minutos.
- 25
- La placa de ensayo es centrifugada a 1500 rpm durante 2 minutos usando la centrífuga top bench de Jouan (Jouan Inc., Nantes, Francia).
 - La placa de ensayo se cuenta usando un TopCount Packard, contándose cada pocillo durante 20 segundos.
- * El volumen de la enzima es dependiente de la actividad enzimática del lote en uso.

30 En un ensayo más preferido, la reacción de la quinasa se lleva a cabo en un volumen final de 10 μl por cada pocillo en una placa CORNING negra sin unión de volumen bajo, de 384 pocillos (N^o de Cat. 3676). Las concentraciones finales de ATP y fosfatidil inositol (PI) en el ensayo son de 1 μM y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. La reacción se inició mediante la adición de ATP.

Los componentes del ensayo se añaden por pocillo como sigue:

- 50 nl de los compuestos de prueba en DMSO al 90 % por cada pocillo, en las columnas 1-20, con 8 concentraciones (paso de dilución en serie de 1/3 y de 1/3,33) en cada pocillo.
- 35
- Control bajo: 50 nl de DMSO al 90 % en la mitad de los pocillos de las columnas 23 a 24 (0,45 % de concentración final).
 - Control alto: 50 nl del compuesto de la referencia (por ejemplo el compuesto del Ejemplo 7 en el documento WO 2006/122806) en la otra mitad de los pocillos de las columnas 23-24 (2,5 μM de concentración final).

ES 2 643 902 T3

- Patrón: 50 nl del compuesto de la referencia como se acaba de mencionar se diluyen de la misma manera que los compuestos del ensayo en los pocillos de las columnas 21-22.
- Se preparan 20 ml de 'tampón' por ensayo:

5 200 µl de TRIS HCl 1 M pH 7,5 (10 mM de concentración final)
 60 µl de MgCl₂ 1 M (3 mM de concentración final)
 500 µl de NaCl 2M (50 mM de concentración final)
 100 µl de CHAPS al 10 % (0,05 % de concentración final)
 200 µl de TDT 100 mM (1 mM de concentración final)
 18,94 ml de agua nanopura

- 10 • se preparan 10 ml de 'PI' por ensayo:

 200 µl de L-alfa-fosfatidilinositol de 1 mg/ml (hígado bovino, Avanti Polar lípidos N.º de Cat. 840042C PM = 909,12) preparado en octilglucósido al 3 % (10 mg/ml de concentración final)
 9,8 ml de 'tampón'

- se preparan 10 ml de 'ATP' por ensayo:

15 6,7 µl de una solución madre de ATP 3 mM dando una concentración final de 1 µM por cada pocillo 10 ml de 'tampón'

- se preparan 2,5 ml de cada constructo de PI3K por cada ensayo en 'PI' con la siguiente concentración final:

 10 nM de PI3K alfa EMV B1075

 25 nM de beta EMV BV949

20 10 nM de delta EMV BV1060

 150 nM de gamma EMV BV950

- se añaden 5 µl de "PI/PI3K" por cada pocillo.
 - se añaden 5 µl "ATP" por cada pocillo para iniciar la reacción.
 - Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos (alfa, beta, delta) o 120 minutos (gamma).
 - La reacción se terminó mediante la adición de 10 µl de Kinase-Glo (Promega N.º de Cat. 6714).
 - Las placas de ensayo fueron leídas después de 10 minutos con un lector Synergy 2 (BioTek, Vermont EE.UU.) con un tiempo de integración de 100 milisegundos y la sensibilidad establecida en 191.
 - Salida: El control superior tiene un conteo de alrededor de 60.000 y el control inferior tiene un conteo de 30.000 o menor
 - Este ensayo de luminiscencia da una relación útil Z' que tiene valores entre 0,4 y 0,7
- 25
- 30

El valor de Z' es una medida universal de la robustez del ensayo. Un valor de Z' entre 0,5 y 1,0 es considerado propio de un ensayo excelente.

Para este ensayo, se preparan los constructos de PI3K mencionados como sigue:

35 1.2 Generación de los constructos de genes

Se utilizan dos constructos diferentes, BV 1052 y BV 1075, para generar las proteínas de la quinasa PI3α para la investigación de los compuestos.

PI3Kα BV-1052 conector p85 (ISH2)-Gly-p110A (D20aa)-etiqueta de His del C-terminal

40 Los productos de PCR para el dominio SH2 entre (ISH2) de la subunidad p85 y para la subunidad p110-a (con una delección de los primeros 20 aminoácidos) son generados y se fusionados mediante la PCR de superposición.

45 El producto ISH2 de PCR se genera a partir de una primera hebra de ADNc utilizando inicialmente a los cebadores gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) y gwG130-p02 (5'-TGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2). Posteriormente, en una reacción secundaria de PCR, Gateway (Invitrogen AG, Basilea, Suiza) mediante una recombinación se añadieron los sitios attB1 y las secuencias de enlace al extremo 5' y al extremo 3' del fragmento de p85 de ISH2, respectivamente, utilizando los

ES 2 643 902 T3

cebadores gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAA T-3') (SEQ ID NO: 3) y gwG152-p04 (5'-TACCATAATCCACCACCACCACCGAAATCCCCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 4).

- 5 El fragmento p110-a también se genera a partir de una primera hebra de ADNc, utilizando inicialmente a los cebadores gwG152-p01 (5'-CTAGTGGAATGTTTACTACCAAATGG-3') (SEQ ID NO: 5) y gwG152-p02 (5'-GTTCAATGCATGCTGTTTAATTGTGT-3') (SEQ ID NO: 6).

10 En una reacción posterior de PCR, se añaden la secuencia del conector y la etiqueta de histidina en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento p110-a respectivamente, utilizando los cebadores gw152-p03 (5'-GGGGGAATTTCCGGTGGTGGTGGTGGGAATTATGGTACTAGTGGAATGTTTACTACCAAATGGA-3') (SEQ ID NO: 7) y gwG152-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGGTGGTGGTGGTCCGTTCAATGCATGCTGTTTAATTGTGT-3') (SEQ ID NO: 8).

15 La proteína de fusión p85-iSH2/p110-a se ensambla en una tercera reacción de PCR mediante el solapamiento de los conectores en el extremo 3' del fragmento ISH2 y en el extremo 5' del fragmento p110-a, utilizando el cebador gwG130-p03 anteriormente mencionado y un cebador que contiene una etiqueta de histidina que se superpone y las secuencias de recombinación AttB2 (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAGCTCCGTGATGGTGGTGGTGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 9).

20 Este producto final se recombina en una reacción OR (Invitrogen) en el vector donante pDONR201 para generar el clon de entrada ORF318. Este clon se verifica mediante secuenciación y se utiliza en una reacción de marco LR de enlace para transferir el inserto en marco de enlace del vector adaptado pBlueBac4.5 (Invitrogen) para la generación del vector de expresión LR410 del Baculovirus.

PI3K α BV-1075 conector p85 (ISH2)-12 XGly-p110A (D20aa)-etiqueta de His del C-terminal

25 Se genera al constructo del Baculovirus BV-1075 mediante una ligación de tres partes que comprende un fragmento de p85 y un fragmento p110-a clonado en el vector pBlueBac4.5. El fragmento de p85 se deriva del plásmido p1661-2 digerido con Nhe/SPE. El fragmento p110-a es derivado de LR410 (véase más arriba) como un fragmento SpeI/HindIII. El vector de clonación pBlueBac4.5 (Invitrogen) se digirió con NheI/HindIII. Lo que da como resultado el constructo PED 153.8

30 El componente p85 (ISH2) se genera mediante PCR utilizando al ORF 318 (descrito anteriormente) como una plantilla y un cebador hacia adelante KAC1028 (5'-GCTAGCATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAG AATATACC) (SEQ ID NO: 10) y dos cebadores inversos, KAC1029 (5'-GCCTCCACCACCTCCGCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGTC) (SEQ ID NO: 11) y KAC1039 (5'-TACTAGTCCGCCTCCACCACCTCCGCCTCCACCACCTCCGCC) (SEQ ID NO: 12).

35 Los dos cebadores inversos se superponen y se incorporan al conector Gly 12x y la secuencia N-terminal del gen P110A al sitio SpeI. El conector Gly 12x reemplaza el conector en el constructo BV1052. El fragmento de PCR se clonó en pCR2.1 TOPO (Invitrogen). De los clones resultantes, se determinó que el p1661-2 es el correcto. Este plásmido se digirió con NheI y SpeI y el fragmento resultante es aislado en gel y purificado mediante una subclonación.

El fragmento p110-a de clonación es generado mediante una digestión enzimática del clon LR410 (véase más arriba) con SpeI y HindIII. El sitio SpeI se encuentra en la región de codificación del gen P110A.

40 El fragmento resultante se aisló en gel y se purificó mediante una subclonación.

45 El vector de clonación, pBlueBac4.5 (Invitrogen) se prepara por medio de una digestión enzimática con NheI y HindIII. El vector de corte se purifica en una columna de Qiagen (Qiagen NV, Venlo, Países Bajos) y después se desfosforila con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) (New England Biolabs, Ipswich, MA). Después de la terminación de la reacción de CIP el vector de corte es purificado de nuevo en la columna para generar el vector final. La ligación de las 3 partes se realizó con una ligasa Rapid de Roche siguiendo las especificaciones del proveedor.

PI3K β BV-949 conector p85 (ISH2)-Gly p110b-etiqueta de His del C-terminal

Los productos de PCR para el inter dominio SH2 (ISH2) de la subunidad p85 y de la longitud completa de la subunidad p110-b se generan y se fusionan mediante la PCR de superposición.

50

El producto ISH2 PCR es generado a partir de una primera hebra de ADNc utilizando inicialmente a los cebadores gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) y gwG130-p02 (5'-TGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2). Posteriormente, en una reacción secundaria de PCR de marco de enlace se añaden (Invitrogen) los sitios de recombinación att B1 y las secuencias de enlace en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento de ISH2 p85 respectivamente, utilizando los cebadores gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAA T-3') (SEQ ID NO: 3) y gwG130-p05 (5'-ACTGAAGCATCCTCCTCCTCCTCCTGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGC-3') (SEQ ID NO: 13).

El fragmento p110-b también se genera a partir de una primera hebra de ADNc utilizando inicialmente a los cebadores gwG130-p04 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGCTTCAGTTTCATAATGCCTCCTGCT-3') (SEQ ID NO: 4) que contienen secuencias de unión y el extremo 5' de p110-b y gwG130-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCAGATCTGTAGTCTTTCCGAACTGTGTG-3') (SEQ ID NO: 14) que contiene las secuencias del extremo 3' de p110-b fusionadas a una etiqueta de histidina.

La proteína de fusión p85-iSH2/p110-b se ensambla mediante una reacción de PCR de superposición de los conectores en el extremo 3' del fragmento de ISH2 y el extremo 5' del fragmento de p110-b, utilizando el cebador gwG130-p03 mencionado y un cebador que contiene una etiqueta de histidina que se superpone y las secuencias de recombinación AttB2 (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 15).

Este producto final se recombina en una reacción Gateway OR (Invitrogen) en el vector donante pDONR201 para generar el clon de entrada ORF253. Este clon se verifica mediante secuenciación y se utiliza en una reacción Gateway LR de enlace para transferir el inserto en el marco del enlace adaptado a vector pBlueBac4.5 (Invitrogen) para la generación del vector de expresión LR280 del Baculovirus.

PI3Kδ BV-1060 conector p85 (ISH2)-Gly (de longitud completa)-etiqueta de His del C-terminal

Los productos de PCR para el dominio SH2 entre (ISH2) de la subunidad p85 y de la longitud completa de la subunidad p110-d se generan y se fusionan mediante la PCR de superposición.

El producto ISH2 de la PCR se genera a partir de una primera hebra de ADNc utilizando inicialmente a los cebadores gwG130-p01 (5'-CGAGAATATGATAGATTATATGAAGAAT-3') (SEQ ID NO: 1) y gwG130-p02 (5'-TGGTTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTCAAT-3') (SEQ ID NO: 2). Posteriormente, en una reacción secundaria de PCR de marco de enlace se añaden (Invitrogen) los sitios de recombinación attB1 y las secuencias de enlace en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento de ISH2 p85 respectivamente, utilizando los cebadores gwG130-p03 (5'-GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACGAAGGAGATATACATATGCGAGAATATGATAGATTATATGAAGAA T-3') (SEQ ID NO: 3) y gwG154-p04 (5'-TCCTCCTCCTCCTCCTCCTGGTTAATGCTGTTTCATACGTTTGTGC-3') (SEQ ID NO: 16).

El fragmento p110-a también se genera a partir de una primera hebra de ADNc utilizando inicialmente a los cebadores gwG154-p01 (5'-ATGCCCCCTGGGGTGGACTGCCCAT-3') (SEQ ID NO: 17) y gwG154-p02 (5'-CTACTGCCTGTTGTCTTTGGACACGT-3') (SEQ ID NO: 18).

En una reacción de PCR posterior se añaden las secuencias conectoras y una etiqueta de Histidina en el extremo 5' y el extremo 3' del fragmento de p110-d, respectivamente, utilizando a los cebadores gw154-p03 (5'-ATTAAACCAGGAGGAGGAGGAGGAGGACCCCTGGGGTGGACTGCCCATGGA-3') (SEQ ID NO: 19) y gwG154-p06 (5'-AGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCCCTGCCTGTTGTCTTTGGACACGTTGT-3') (SEQ ID NO: 20).

La proteína de fusión p85-iSH2/p110-d es ensamblada en una tercera reacción de PCR mediante el solapamiento de los conectores en el extremo 3' del fragmento de ISH2 y en el extremo 5' del fragmento de p110-d, usando el gwG130-p03 cebador mencionado y un cebador que contiene una etiqueta de histidina que se superpone y las secuencias AttB2 de recombinación del marco de enlace (Invitrogen) (5'-GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAAGCTCCGTGATGGTGATGGTGATGTGCTCC-3') (SEQ ID NO: 21).

Este producto final se recombina en una reacción Gateway OR (Invitrogen) en el vector donante pDONR201 para generar el clon de entrada ORF319. Este clon se verifica mediante secuenciación y se utiliza en una reacción Gateway LR de enlace para transferir el inserto en el marco de enlace del vector pBlueBac4.5 adaptado (Invitrogen) para la generación del vector LR415 de expresión de Baculovirus.

PI3K BV-950 p110g (D144aa)-etiqueta de His del C-terminal

Este constructo se obtiene del laboratorio Roger Williams, Laboratorio MRC de Biología Molecular de Cambridge, Reino Unido (noviembre de 2003). Descripción del constructo disponible en: Pacold ME et al. (2000) Cell 103, 931-943.

5 **1.3 expresión y purificación de proteínas**

Métodos para generar Baculovirus recombinante y la proteína de las isoformas de PI3K:

Los plásmidos pBlue-bac4.5 (para las isoformas a, b, y d) o el pVL1393 (para la isoforma g) que contienen los diferentes genes de la quinasa PI3 se cotransfectan con ADN genómico BaculoGold WT (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), utilizando los métodos recomendados por el fabricante.

10 Posteriormente, el Baculovirus recombinante obtenido a partir de la transfección se purifica en placa en células de insecto Sf9 para producir células aisladas que expresan la proteína recombinante.

15 Los clones positivos se seleccionan mediante western anti-HIS o del anticuerpo anti-isoforma. Para las isoformas alfa y delta PI3K, se realiza una segunda purificación en placa en las primeras cepas clones virales de PI3K. La amplificación de todos los Baculovirus aislados se lleva a cabo con una baja multiplicidad de infección (moi) para generar un título alto, un almacén de bajo flujo para la producción de proteína. Los Baculovirus se designaron como BV1052 (α) y BV1075 (α), BV949 (β), BV1060 (δ) y BV950 (γ).

20 La producción de proteínas implica infección (pasaje 3 o inferior) de las células suspendidas Tn5 (*Trichoplusia ni*) o TiniPro (Expression Systems, LLC, Woodland, CA, EE.UU.) en medios libres de proteínas con un moi de 2-10 para 39-48 horas en frascos Erlenmeyer vidrio de 2 l (110 rpm) o en biorreactores de onda (22-25 rpm). Inicialmente, se alimentan los biorreactores de onda con 10 l de volumen de trabajo a una densidad de 3×10^5 células/ml a la mitad de la capacidad (5 l). El reactor se sacude a 15 rpm durante la fase de crecimiento de las células durante 72 horas, suplementado con una mezcla de aire 5 % con oxígeno (0,2 l por minuto). Inmediatamente antes de la infección, se analizaron los cultivos del reactor de onda para determinar la densidad, la viabilidad y se diluyeron a una densidad de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células/ml. Se añaden 100-500 ml de la solución concentrada, de virus de bajo flujo tras 2-4 horas de cultivo adicional. El oxígeno se incrementó hasta una concentración del 35 % para el período de infección 39-48 horas y la se aumentó la oscilación de la plataforma a 25 rpm. Durante la infección, las células son supervisadas con un analizador de viabilidad Vicell (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, EE.UU.) del bioproceso para determinar la viabilidad, el diámetro y la densidad. Las lecturas del Bioanalizador Nova (Nova Biomedical Corp., Waltham, MA, EE.UU.) de diversos parámetros y metabolitos (pH, saturación de O_2 , glucosa, etc.) se toman cada 30 12-18 horas hasta la cosecha.

Las células del biorreactor de onda se recogen dentro de 40 horas después de la infección. Las células se recogieron mediante una centrifugación (4 grados C a 1500 rpm), y posteriormente se mantuvieron en hielo durante la acumulación de los sedimentos para la lisis y su purificación. Los grupos de sedimentos acumulados se hacen con pequeñas cantidades de medio de Grace frío, no suplementado (sin inhibidores de la proteasa).

35 Protocolo de purificación de la PI3K alfa para HTS (BV1052)

40 La PI3K alfa se purifica en tres etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad con metal inmovilizado en una resina de Sefarosa de Ni (GE Healthcare, perteneciente a General Electric Company, Fairfield, CT, EE.UU.), una filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare), y finalmente una etapa de intercambio catiónico en una columna de SP-XL (GE Healthcare). Todos los tampones se enfrían a 4 °C y la lisis se lleva a cabo enfriando en hielo. El fraccionamiento en columna se realiza rápidamente a temperatura ambiente.

45 Las células de insecto típicamente congeladas son lisadas en un tampón hipertónico de lisis y se aplican a una columna preparada IMAC. La resina se lava con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido de 3-5 volúmenes de columna de tampón de lavado que contiene imidazol de 45 mM, y la proteína objetivo se eluyó a continuación con un tampón que contiene imidazol de 250 mM. Las fracciones se analizaron mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y se agruparon las fracciones que contienen a la proteína objetivo y se aplicaron a una columna preparada de GFC. Las fracciones de la columna GFC son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contienen a la proteína objetivo se agrupan. El grupo obtenido de la columna de GFC se diluye en un tampón de baja salinidad y se aplica a una columna preparada de SP-XL. La columna se lava con tampón de baja salinidad hasta que se consigue una línea de base estable de absorbancia A280, y se eluye usando un gradiente de volumen de columna de NaCl de 20 mM de 0 a 500 mM de NaCl. Una vez más, las fracciones de la columna de SP-XL son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contenían a la proteína objetivo se agrupan. El grupo final se dializó en un tampón de almacenamiento que contiene 50 % de glicerol y se almacenó a -20° C. El grupo final se ensayó para

determinar la actividad en un ensayo de la fosfoinositol quinasa.

Protocolo de purificación de la PI3K beta para HTS (BV949)

La PI3K beta se purifica en dos etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) en una resina de Sefarosa de Ni (GE Healthcare) y una filtración en gel (GFC) utilizando una columna Superdex de 200 26/60 (GE Healthcare). Todos los tampones se enfrían a 4 °C y la lisis se lleva a cabo enfriando en hielo. El fraccionamiento en columna se realiza rápidamente a temperatura ambiente.

Las células de insecto típicamente congeladas son lisadas en un tampón hipertónico de lisis y se aplican a una columna preparada IMAC. La resina se lava con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido de 3-5 volúmenes de columna de tampón de lavado que contiene imidazol de 45 mM, y la proteína objetivo se eluyó a continuación con un tampón que contiene imidazol de 250 mM. Las fracciones se analizaron mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y se agruparon las fracciones que contienen a la proteína objetivo y se aplicaron a una columna preparada de GFC. Las fracciones de la columna GFC son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contienen a la proteína objetivo se agrupan. El grupo final se dializó en un tampón de almacenamiento que contiene 50 % de glicerol y se almacenó a -20 °C. El grupo final se analizó para determinar la actividad en el ensayo de la fosfoinositol quinasa.

Protocolo de purificación de la PI3K gamma para HTS (BV950)

La PI3K gamma se purifica en dos etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) en una resina de Sefarosa de Ni (GE Healthcare) y una filtración en gel (GFC) utilizando una columna Superdex de 200 26/60 (GE Healthcare). Todos los tampones se enfrían a 4 °C y la lisis se lleva a cabo enfriando en hielo. El fraccionamiento en columna se realiza rápidamente a temperatura ambiente. Las células de insecto típicamente congeladas son lisadas en un tampón hipertónico de lisis y se aplican a una columna preparada IMAC. La resina se lava con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido de 3-5 volúmenes de columna de tampón de lavado que contiene imidazol de 45 mM, y la proteína objetivo se eluyó a continuación con un tampón que contiene imidazol de 250 mM. Las fracciones se analizaron mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y se agruparon las fracciones que contienen a la proteína objetivo y se aplicaron a una columna preparada de GFC. Las fracciones de la columna GFC son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contienen a la proteína objetivo se agrupan. El grupo final se dializó en un tampón de almacenamiento que contiene 50 % de glicerol y se almacenó a -20 °C. El grupo final se analizó para determinar la actividad en el ensayo de la fosfoinositol quinasa.

Protocolo de purificación de la PI3K delta para HTS (BV1060)

La PI3K delta se purificó en tres etapas cromatográficas: cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC) en una resina de Sefarosa de Ni (GE Healthcare), una filtración en gel (GFC) utilizando una columna Superdex de 200 26/60 (GE Healthcare), y finalmente una etapa de intercambio aniónico en una columna de Q-HP (GE Healthcare). Todos los tampones se enfrían a 4 °C y la lisis se lleva a cabo enfriando en hielo. El fraccionamiento en columna se realiza rápidamente a temperatura ambiente. Las células de insecto típicamente congeladas son lisadas en un tampón hipertónico de lisis y se aplican a una columna preparada IMAC. La resina se lava con 3-5 volúmenes de columna de tampón de lisis, seguido de 3-5 volúmenes de columna de tampón de lavado que contiene imidazol de 45 mM, y la proteína objetivo se eluyó a continuación con un tampón que contiene imidazol de 250 mM. Las fracciones se analizaron mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y se agruparon las fracciones que contienen a la proteína objetivo y se aplicaron a una columna preparada de GFC. Las fracciones de la columna GFC son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contienen a la proteína objetivo se agrupan. El grupo de la columna de GFC se diluye en un tampón de baja salinidad y se aplicó a una columna preparada de Q-HP. La columna se lava con tampón de baja salinidad hasta que se consigue una línea de base estable de absorbancia A280, y se eluye usando un gradiente de volumen de columna de NaCl de 20 mM de 0 a 500 mM de NaCl. Una vez más, las fracciones de la columna de SP-XL son analizados mediante una tinción de Coomassie de los geles SDS-pAGE, y las fracciones que contenían a la proteína objetivo se agrupan. El grupo final se dializó en un tampón de almacenamiento que contiene 50 % de glicerol y se almacenó a -20 °C. El grupo final se ensayó para determinar la actividad en un ensayo de la fosfoinositol quinasa.

La CI_{50} se determina mediante una curva de ajuste de rutina de cuatro parámetros que viene junto con "ajuste de Excel". Se utiliza Una ecuación logística de cuatro parámetros para calcular los valores de CI_{50} (IDBS XLfit) del porcentaje de inhibición de cada compuesto a 8 concentraciones (por lo general 10, 3,0, 1,0, 0,3, 0,1, 0,030, 0,010 y 0,003 M). Alternativamente, los valores de CI_{50} se calculan utilizando el modelo 204 del idbsXLfit, que es un modelo logístico de 4 parámetros.

Sin embargo, alternativamente, para un ensayo de agotamiento de ATP, los compuestos a ensayar se disolvieron en DMSO y se distribuyen directamente en una placa blanca de 384 pocillos con un volumen de 0,5 µl por pocillo. Para iniciar la reacción, se añadieron 10 µl de PI3 quinasa 10 nM y 1 alfa-fosfatidilinositol (PI) 5 µg/ml a cada pocillo seguido de 10 µl de ATP 2 mM. La reacción se lleva a cabo hasta que se agota aproximadamente el 50 % del ATP,

y luego se detiene mediante la adición de 20 μ l de solución de Kinase-Glo (Promega Corp., Madison, WI, EE.UU.). La reacción detenida se incuba durante 5 minutos y el resto de ATP se detecta a continuación, a través de la luminiscencia. Los valores de la IC_{50} se determinan a continuación.

5 En una realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 500 nM.

En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 100 nM.

10 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 0,5 nM y 10 nM.

15 En una realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 1000 nM.

En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 500 nM.

20 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre una o más de las otras isoformas en el que esta selectividad es de al menos 10 veces.

En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre una o más de las otras isoformas en el que esta selectividad es de al menos 20 veces.

25 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre los diferentes parálogos PI3K α y PI3K β en el que esta selectividad es de al menos 10 veces.

30 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre los diferentes parálogos PI3K α y PI3K β en el que esta selectividad es de al menos 20 veces.

35 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 500 nM y en el que dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre los diferentes parálogos PI3K α y PI3K β en el que esta selectividad es de al menos 10 veces.

40 En otra realización de la presente invención, el inhibidor de PI3K, en donde dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K, en donde el intervalo de actividad, expresado como IC_{50} , en el ensayo enzimático de la PI3K delta es de entre 1 nM y 500 nM y en el que dicho inhibidor tiene una acción inhibidora sobre la isoforma delta de la PI3K donde el inhibidor muestra una selectividad para la isoforma delta de PI3K sobre los diferentes parálogos PI3K α y PI3K β en el que esta selectividad es de al menos 20 veces.

2. Ensayos celulares

2.1 Fosforilación de Akt 1/2 (S473) mediada por la fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) en células Rat-1

45 Las células Rat-1 que sobreexpresan establemente una forma miristoilada de la subunidad catalítica de la fosfoinositido-3-quinasa (PI3K) alfa, beta o delta humana se sembraron en placas de 384 pocillos a una densidad de 7500 (PI3K alfa), 6200 (PI3K beta), o 4000 (PI3K delta) células en 30 μ l de medio de crecimiento completo (medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM alto en glucosa) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (v/v), MEM aminoácidos no esenciales de 1 % (v/v), HEPES de 10 mM, L-glutamina de 2 mM, puromicina 10 mg/ml de y Penicilina/Estreptomicina al 1 % (v/v)) y se incubaron a 37 % de C/CO_2 al 5 %/95 % de humedad durante 24 h. Los compuestos se diluyeron en placas de compuestos de 384 pocillos para obtener diluciones en serie de 8 puntos de 50 40 compuestos de prueba en DMSO al 90 %, así como 4 compuestos de referencia, 16 controles superiores y 16 controles inferiores (inhibidos). Las placas de predilución se prepararon por dispensación de pipeteado 250 nl de

soluciones del compuesto en placas de polipropileno de 384 pocillos utilizando un dispensador de nanolitros Hummingwell. Los compuestos se diluyen previamente mediante la adición de 49,75 µl medio de crecimiento completo. Se transfirieron 10 µl de la solución de compuesto prediluida a la placa de las células usando un pipeteador de 384 pocillos, lo que resulta en una concentración final de DMSO de 0,11 %.

- 5 Las células se incubaron durante 1 h a 37 % C/CO₂ al 5 %/95 % de humedad. Se retiró el sobrenadante, las células se lisaron en 20 µl de tampón de lisis para detección AlphaScreen® SureFire®.

10 Para la detección del p-AKT (Ser473), se utilizó el Kit de ensayo p-Akt (Ser473) de SureFire® (Perkin Elmer, EE.UU.). Se transfirieron 5 µl de lisado celular a Proxiplacas de 384 pocillos de bajo volumen para la detección utilizando una pipeta de 384 pocillos. La adición de los reactivos AlphaScreen® SureFire® se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. En primer lugar, se añadieron 5 µl del tampón de reacción además de la mezcla de
15 tampón de activación que contiene AlphaScreen® perlas de aceptores, la placa se selló, y se incubaron en un agitador de placas durante 2 horas a temperatura ambiente. En segundo lugar, se añadieron 2µl de dilución de tampón que contiene perlas donantes de AlphaScreen®, y la placa se incubó en un agitador de placas como anteriormente durante 2 horas. La placa se leyó en un lector de placas compatibles con AlphaScreen®, utilizando las configuraciones convencionales de AlphaScreen®.

2.2 Determinación de la activación de células B murinas

20 Se ha reconocido a la PI3Kδ como agente modulador de la función de las células B cuando las células son estimuladas a través del receptor de células B (BCR) (Okkenhaug et al. Ciencia 297:1031 (2002)). Para la evaluación de la propiedad inhibidora de los compuestos en la activación de las células B, se midió el aumento de la regulación de los marcadores de activación CD86 y CD69 en las células B murinas derivadas de anticuerpo de bazo de ratón después de la estimulación con anti-IgM. El CD69 es un marcador de activación bien conocido por las células B y T (Sancho et al. Tendencias Immunol. 26:136 (2005)). El CD86 (también conocido como B7-2) que se expresa principalmente en las células presentadoras de antígeno, incluyendo las células B. Las células B en reposo expresan CD86 en niveles bajos, pero que aumentan la producción después de la estimulación de, por ejemplo el
25 receptor BCR o del receptor de IL-4. El CD86 en una célula B interactúa con el CD28 en las células T. Esta interacción es necesaria para la activación óptima de las células T y para la generación de una respuesta óptima por parte de IgG1 (Carreno et al. Annu Rev. Immunol. 20:29 (2002)).

30 Se recogen los bazos de los ratones Balb/c, los esplenocitos se aislaron y se lavaron dos veces con RPMI que contiene 10 % de suero fetal bovino (FBS), HEPES de 10 mM, penicilina/estreptomicina de 100 unidades/ml. Al RPMI suplementado de esta manera se hace referencia en adelante como medio. Las células se ajustaron a 2,5 X 10⁶ células/ml en medio y se añaden 200 µl de suspensión celular (5 x10⁶ células a los pocillos apropiados de las placas de 96 pocillos.

35 A continuación, las células se estimulan mediante la adición de 50 µl de mAb anti-IgM en el medio (concentración final: 30 mg/ml). Después de la incubación durante 24 horas a 37 °C, las células se tiñeron con los siguientes cócteles de anticuerpos: CD86-FITC anti-ratón, CD69-perCP-Cy5.5anti-ratón, CD19-perCP anti-ratón para la evaluación de las células B, y FITC-CD3anti ratón, CD69-pE anti ratón para la evaluación de las células T (2 µl de cada anticuerpo/pocillo). Después de una hora a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad, las células se transfieren a placas profundas de 96

40 pocillos. Las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS que contenía FBS al 2 % y después de la re-suspensión en 200 µl las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur. Los linfocitos son detectados en el gráfico de puntos de FSC/SSC en función del tamaño y la granularidad y analizados para la expresión de CD19, CD3 y de marcadores de activación (CD86, CD69). Los datos se calculan a partir de transferencias de puntos como el porcentaje de células teñidas positivamente para los marcadores de activación dentro de la población CD19+ o CD3+ que usa software BD CellQuest.

45 Para la evaluación de la propiedad inhibidora de los compuestos, los compuestos se disuelven primero y se diluyeron en DMSO seguido de una dilución 1:50 en medio. Se aislaron los esplenocitos de ratones Balb/c, se volvieron a suspender y se transfieren a placas de 96 pocillos como se describe anteriormente (200 µl/pocillo). El disolvente diluido o los compuestos se añaden a las placas (25 µl) y se incuban a 37 °C durante 1 hora. A continuación, los cultivos se estimularon con 25 µl de mAb anti-IgM/pocillo (concentración final 30 mg/ml) durante 24
50 horas a 37 °C y se tiñeron con CD86-FITC anti-ratón y CD19-perCP anti-ratón (2 µl de cada anticuerpo/pocillo). La expresión de CD86 en las células CD19 positivas B se cuantificó mediante una citometría de flujo como se describe anteriormente.

2.3 Determinación de la activación de las células B de rata

Se ha reconocido a la PI3Kδ como agente que modula la función de las células B cuando las células son estimuladas a través del receptor de células B (BCR) (Okkenhaug et al. Ciencia 297:1031 (2002). Para la evaluación de la propiedad inhibidora de los compuestos en la activación de las células B, se midió el aumento de la regulación de los marcadores de activación CD86 en las células B de rata derivados de la sangre total después de la estimulación con anti-IgM e IL-4 recombinante. La molécula de CD86 (también conocido como B7-2) se expresa principalmente en células presentadoras de antígeno, incluyendo las células B. Las células B en reposo expresan CD86 en niveles bajos, pero aumentan la producción después de la estimulación de, por ejemplo el receptor BCR o el receptor de IL-4. El CD86 en una célula B interactúa con el CD28 en las células T. Esta interacción es necesaria para la activación óptima de células T y para la generación de una respuesta óptima por parte de IgG1 (Carreño et al. Annu Rev. Immunol. 20:29 (2002)).

Recolección de la sangre de rata

La sangre entera se recogió de la aorta abdominal de adulto ratas Lewis (LEW/HanHsd) adultas de sexo masculino oby usando una jeringa de 10 ml con aguja hipodérmica pre-recubierta con heparina sódica. La sangre se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y la concentración de anticoagulante se ajustó a 100 U/ml.

Estimulación de las células B de rata y tratamiento con un inhibidor específico

Para la evaluación de los efectos in vitro de los fármacos inmunosupresores, la sangre heparinizada se diluyó previamente en un 50 % con medio. Como medio se proporcionaba DMEM alto en glucosa (Animed N.º de cat. 1-26F01-I) suplementado con penicilina de 100 U/ml, estreptomina de 100 mg/ml, L-glutamina 2 mM, dextrano 40 de 50 mg/ml y suero fetal de ternera al 5 % (FCS, Fetaclone I, Gibco N.º 10270-106). Entonces, se añadieron 190 µl de sangre prediluida a 10 µl de compuesto de ensayo pre-diluido en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U (Nunc), resultando en una serie de dilución de 3 veces con un intervalo de concentración de 20 a 0,0003 µM. Los pocillos de control se trataron previamente con DMSO para obtener una concentración final de 0,5 % de DMSO. Los cultivos se iniciaron en duplicado, se mezclaron bien por agitación en un agitador de placas (Heidolph Titramax 101; 30 s, velocidad de 900), pipeteando arriba y abajo y se agitan as placas en el agitador de placas de nuevo. Los cultivos se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 1 h. A continuación, se añadieron 20 µl de anticuerpo policlonal de cabra Ab anti-IgM de rata (Serotec, n.º de cat 302001) y 10 µl de rIL-4 recombinante diluida (Immunotools N.º 340085) para obtener las concentraciones finales de 30 mg/ml y 5 ng/ml, respectivamente. Las placas se mezclaron por agitación en un agitador de placas como anteriormente y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %.

Determinación de la activación de las células B mediante citometría de flujo

Después de la incubación, se añadió a cada pocillo 15 µl de una solución de EDTA de 25 mM y se agita durante 15 minutos para separar las células adherentes. Para el análisis de los marcadores de activación de superficie, las muestras fueron teñidas con PE-Cy5-marcado con anti-ratCD45RA (cat. BD N.º 557015) para permitir la recolección en las células B en el análisis FACS. Además, las muestras se tiñeron con PE marcado con anti-rata CD86 (BD cat N.º 551396). Todos los procedimientos de tinción se realizaron a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Después de la incubación, las muestras se transfirieron a placas de microtitulación con fondo en V de 96 pocillos profundos (Corning N.º 396096) que contienen 2 ml/poso de solución de lisis BD (BD N.º 349202). Después de la lisis de los eritrocitos las muestras se lavaron con 2 ml de CellWash (BD N.º 349524). Los datos fueron adquiridos en una LSRII o citómetro de flujo FACS calibur (BD Biosciences) utilizando el software Cellquest Plus o DIVA (versión 6.1.1), respectivamente. Los linfocitos fueron registrados en el dot blot FSC/SSC en función del tamaño y la granularidad y analizados para la expresión de CD45RA y de los marcadores de activación. Los datos se calculan a partir de transferencias de puntos o histogramas como porcentaje de células teñidas positivamente para los marcadores de activación en la población CD45RA+.

Evaluación estadística

El porcentaje de inhibición de la activación de células B después de la exposición al fármaco se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100X \frac{\text{estimulación sin fármaco} - \text{estimulación con fármaco}}{\text{estimulación sin fármaco} - \text{no estimulado}}$$

Se utilizó al software 7de ORIGEN (OriginLab Corporation, Northampton, MA) para ajuste de la curva de regresión no-lineal. La concentración de fármaco que resulta en una inhibición del 50 % (CI₅₀) se obtuvo mediante el ajuste de la ecuación de Hill para los datos de inhibición.

2.4 Determinación de IL-6 inducida por TLR9 en esplenocitos de ratón

Preparación de suspensión de células individuales a partir de bazo de ratón

Los bazos fueron disecados de ratones C57BL/6 inmediatamente después de la eutanasia. El exceso de grasa se recortó del bazo antes de machacar el bazo a través de un filtro de células de 0.4 μM con el émbolo de una jeringa de 5 ml. se preparó una única suspensión de células y se ajustó el volumen a 15 ml en un tubo Falcon de 50 ml utilizando PBS frío. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C antes de la remoción del sobrenadante y de la re-suspensión en 5 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos por el bazo y la incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió PBS enfriado con hielo (30 ml) a las células antes de la centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante se retiró y las células se lavaron dos veces con 40 ml de medio de cultivo de esplenocitos murinos (MSCM). MSCM consistió en RPMI suplementado con penicilina de 100 unidades/ml y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aminoácidos no esenciales 1x, piruvato de sodio de 1 mM, β -mercaptoetanol 0.05 mM, y 10 % de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor. Las células se resuspendieron en 10 a 20 ml de MSCM y se contaron usando un contador de células Countess. Se obtuvieron Aproximadamente 60×10^6 esplenocitos a partir de un sola de bazo de ratón C57BL/6.

15 Estimulación de esplenocitos murinos y tratamiento con un inhibidor específico

Los esplenocitos se cultivaron en placas a una densidad final de 2×10^5 células/pocillo en un volumen de 100 μl en placas de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron en una incubadora humidificada de 37 °C durante 2-4 horas. Después, los compuestos a ensayar se dispensaron utilizando una máquina de manipulación de líquidos automatizada usando placas madre de compuestos previamente preparados. Las Placas Madre consistían de compuestos (en 90 %/10 % DMSO/ddH₂O) dispuestos en el punto 8-10 usando diluciones de 2-o 3 veces. La máquina de manipulación de líquido dispensaba 1 μl de cada dilución de la placa de compuesto previamente preparado de fuente en el pocillo adecuado en la placa de 96 pocillos. La concentración final de partida de los compuestos en el cultivo celular fue de 10 μM . La concentración final de DMSO en los cultivos de células fue de 0.5 %. Las células se incubaron con los compuestos durante 1 hora antes de la adición del ligando de TLR. A continuación, se añadió una concentración EC₈₀ de CpG1826 10x en un volumen de 20 μl (para un volumen final de cultivo de 200 μl) después de lo cual se incubaron durante la noche en una incubadora humidificada a 37 °C.

Determinación de la interleucina-6 mediante ELISA

Después del cultivo durante la noche, las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se transfirieron 150 μl de cada cultivo a placas de 96 pocillos con fondo en V y se midieron los niveles de IL-6 usando el kit de ELISA comercialmente disponible de IL-6 de ratón de tipo sándwich. Brevemente, las placas se recubrieron durante la noche con el anticuerpo de captura antes de bloquear durante 1 hora con PBS/0.1 % de BSA. Las muestras y los patrones se añadieron en un volumen de 50 μl y la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la eliminación de los estándares/muestras, se lavó la placa con PBS/0.05 % de Tween antes de la adición de 50 μl de anticuerpo de detección biotinilado después de lo cual la placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Las placas se lavaron de nuevo antes de la adición de 50 μl de estreptavidina peroxidasa de rábano picante por pocillo durante 20 minutos. Después se lava la placa antes de la adición de 50 μl de sustrato TMB a cada pocillo y las placas se incubaron durante 20 minutos antes de adición de 25 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de solución de parada. Se midieron los niveles de IL-6 usando un lector de placas SpectraMax 190 (450 nm) y se analizaron usando el software GraphPad Prism SoftMax Pro.

40 **2.5 Determinación de IFN-alfa en células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) inducida por TLR9**

Preparación de PBMC a partir de sangre humana fresca

La sangre humana (ca. 75 ml) se recogió en tubos de 10 S-Monovette que contienen heparina (S-Monovette 7.5 ml NH Heparina 16 UI/ml de sangre; Starstedt). Se prepararon tubos Leucosep™ (30 ml N.º 227290; Greiner Bio-One) mediante la adición de 15 ml de medio de separación de linfocitos LSM1077™ por tubo (N.º J15-004; PAA Laboratories) y centrifugación durante 30 s a 1000 g. Se transfirió algunos de los 25 ml de sangre a tubos Leucosep™ tras la dilución con partes iguales de PBS (sin Ca²⁺ +/Mg²⁺, N.º 14190-094). Las muestras se centrifugaron a 800 g durante 20 min a 22 °C utilizando una centrífuga Eppendorf 5810R sin freno. La capa de PBMC se retiró cuidadosamente a partir del plasma: la interfaz del medio de separación y se transfiere al tubo limpio de 50 ml. Las células se lavaron una vez mediante la adición de PBS (hasta 45 ml) y se centrifugaron (1400 rpm, 10 min a 22 °C) con freno (a velocidad 9) utilizando una Eppendorf 5810R. Las células sedimentadas se resuspendieron cuidadosamente en los medios (RPMI 1640 + GlutaMAX-I, 0.05 mM 2-mercaptoetanol, 10 mM de HEPES y 5 % v/v de FCS) y muestras combinadas. Los componentes del medio 2-mercaptoetanol (N.º 31350-010, 50 mM), Hepes (N.º 15630-056, 1M) y RPMI 1640 (1x) + GlutaMAX-I (N.º 61870-010) se obtuvieron de Gibco. El FCS (N.º 2-01F36-1) se obtuvo de Amimed. El PBMC se contó usando un contador de células Countess® automatizado (muestra fue

de 01:10 de prediluidos en los medios de comunicación, antes de la adición de un volumen igual (10 µl) de azul de tripano). Las células se diluyeron a 4×10^6 células/ml y se sembraron en placas de 384 pocillos (N.º 353962; Becton Dickinson AG) para dar un volumen final de 25 µl (es decir, 1×10^5 células/pocillo).

Estimulación de PBMC y el tratamiento con un inhibidor específico

5 Los compuestos fueron prediluidos en DMSO 100 al % v/v (N.º 41640-100 ml, Sigma-Aldrich), seguido de transferencia el medio (para lograr una concentración final de DMSO de 0,25 %). Las células fueron tratadas con la dilución del compuesto apropiado (5 µl) o control de vehículo (5 µl) y se incubaron durante 30 min a 37 °C en una incubadora humidificada en aire con 5 % (v/v) de CO₂. Las células se estimularon con CpG2216 (0,3 M; N.º tlr-Hodna; Invivogen) o control de vehículo (10 µl/pocillo) y se incubaron durante 20 h. Las placas se centrifugaron brevemente (200 xg durante 2 min a 22 °C) y las muestras de sobrenadante (30 µl) se retiraron para la cuantificación de los niveles de IFNα.

Cuantificación de IFNα utilizando la tecnología AlphaLISA

15 Para la cuantificación de IFN alfa se utilizó el Kit AlphaLISA de interferón humano (N.º AL264F) de PerkinElmer. Una mezcla de anticuerpos que contiene perlas aceptor anti-IFNα (5 µg/ml final) y anticuerpo biotinilado anti-IFNα (0.5 nM final) se preparan frescos y se dispensan (5 µl) en OptiPlates™ de 384 pocillos (N.º 6007299; PerkinElmer). La dilución de los estándares conocidos de IFNα (IFNα B humana (2b)) se prepararon y se añadieron junto con los sobrenadantes de células (5 µl) a las placas descritas más arriba. Las placas se centrifugaron brevemente (pulso a 200 g), cubiertos con la película de sellado adhesiva, se agitaron con vórtex y se incubaron 1 h a temperatura ambiente en la oscuridad. Las perlas donantes recubiertas de estreptavidina (20 µg/ml final) se prepararon y se añadieron a cada pocillo (5 µl) en una zona oscura iluminada (mezcla sensible a la luz). Las placas se incubaron 30 min a temperatura ambiente (Las placas no deben ser centrifugadas o cubiertos). Después de la incubación, las placas se leyeron con un lector multidisco Envision™ equipado con la opción ALPHA usando los propios ajustes "estándar AlphaScreen" del instrumento (por ejemplo, el tiempo total de medición: 550 ms, Laser 680 tiempo nm de excitación: 180 ms, espejo: D640 como, filtro de emisión: M570w, centro de la longitud de onda de 570 nm, ancho de banda de 100 nm, la transmitancia 75 %). Los datos fueron recogidos para el análisis y la cuantificación de los niveles de IFNα.

Evaluación y análisis de datos

30 Los datos fueron analizados utilizando el programa Excel XL fit 4.0 (Microsoft) con complemento de XLfit (IDBS; versión 4.3.2). Las Concentraciones específicas de IFNα se determinaron después de extrapolación a las curvas de calibración utilizando IFNα B humana (2b). Los valores individuales de CI₅₀ de los compuestos se determinaron por regresión no lineal después del montaje de las curvas a los datos experimentales.

3. Determinación de la producción de anticuerpos para eritrocitos de oveja (SRBC).

35 En resumen, las ratas OFA se inyectaron por vía intravenosa con eritrocitos de oveja en d0 y se trataron por vía oral en cuatro días consecutivos (D0 a D3) con los compuestos objeto de la investigación. Las suspensiones de células de bazo se prepararon en d4 y los linfocitos se sembraron en agar blando en presencia de células indicadoras (SRBC) y complemento. La lisis de las células indicadoras, debido a la secreción de anticuerpos específica de SRBC (predominantemente de la subclase IgM) y la presencia de complemento produjo placas. El número de placas por placa se contaron y se expresó como número de placas por bazo.

40 Inmunización: Fueron inmunizadas grupos de cinco ratas OFA hembras el día 0 con 2×10^8 /ml de SRBC (obtenido de Laboratorio Animal Services LAS, NovartisPharma AG) en un volumen de 0,5 ml por rata por vía intravenosa por inyección.

45 Tratamiento con el Compuesto: Los animales fueron tratados con el compuesto suspendido en CMC al 0,5 %, Tween ® 80 al 0,5 % por 4 días consecutivos (días 0, 1, 2 y 3) a partir del día de la inmunización. El compuesto se administra por vía oral dos veces al día con 12 horas caso, los intervalos entre las dosis en un volumen de aplicación de 5 ml/kg de peso corporal.

Preparación de las suspensiones de células de bazo:

50 En el día 4, los animales fueron sometidos a eutanasia con CO₂. Los bazos se retiraron, se pesaron, y se depositaron en tubos de plástico que contienen 10 ml de solución de sal equilibrada de Hank frío (4°C) (HBSS; Gibco, pH 7.3, que contiene 1 mg Phenolred/100ml) para cada bazo de rata. Los bazos se homogeneizaron con un agitador de vidrio, se dejó en hielo durante 5 minutos y se transfirió 1 ml de sobrenadante a un nuevo tubo. Las células se lavaron una vez en 4 ml de HBSS a continuación, se descartaron los sobrenadantes y los pellets se resuspendieron en 1 ml de HBSS. El número de linfocitos por el bazo se determinó por el contador de células automatizado y se ajustaron las suspensiones de células de bazo a una concentración celular de 30×10^6 /ml.

Ensayo de formación de placa:

Se prepararon placas de Petri de agar suave con agarosa al 0,7 % (SERVA) en HBSS.

Además, se preparó un ml de agarosa al 0,7 % en tubos de plástico y se mantuvo a 48 °C en un baño de agua. En algunos se añadió 50 µl de una suspensión de células de bazo 30×10^6 /ml y 50 µl de SRBC a 40×10^8 /ml, se mezcla rápidamente (Vortex) y se vierte sobre las placas preparadas de agarosa. Las placas de Petri fueron ligeramente inclinadas para lograr una distribución uniforme de la mezcla de células en la capa de agarosa. Las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se incubaron a 37 °C durante 60 minutos. A continuación, se añadió 1,4 ml complemento de cobaya (Harlan; 10 %) y la incubación continuó durante otros 60 minutos a 37 °C. Los anticuerpos SRBC específicos liberados por las células B fuera de la placa unidos al antígeno (GRC) en sus proximidades. Estos complejos antígeno-anticuerpo activan el complemento y condujeron a la lisis de la SRBC dejando un punto brillante (la placa) dentro de la capa roja de eritrocitos. Se contaron las placas con un microscopio.

Se utilizó la siguiente fórmula para la determinación de la inhibición de la formación de la placa:

$$\% \text{ de inhibición} = C * 100/V - 100$$

con: V = número de placas/bazo para el grupo de vehículo, C = número medio de placas/bazo para el grupo de compuestos tratados

Referencias:

N.K. Jerne & A.A. Nordin (1963) Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. Science 140:405.
 N.K. Jerne, A.A. Nordin & C. Henry (1963) The agar plaque technique for recognizing antibody-producing cells. En: "Cell Bound Antibodies", B. Amos & H. Koprowski, Eds., Wistar Inst. Press, Philadelphia pp.109-125.

Datos biológicos

Ensayo enzimático

Ejemplo	PI3K alfa (µM)	PI3K delta (µM)
F1	0,109	0,003

Ensayos celulares

Ejemplo	Células PI3K δ/CI ₅₀ [umol l-1]	RWB/CI ₅₀ CD86 [nmol l-1]
F1	0,011	7

25

REIVINDICACIONES

1. La forma cristalina anhidra de (1,1-dioxo-hexahidro-1-lambda*6*-tiopiran-4-il)-{(S)-3-[1-(6-metoxi-5-metil-piridin-3-il)-2,3-dihidro-1H-pirido[3,4-b][1,4]oxazin-7-iloxi]-pirrolidin-1-il}-metanona.
- 5 2. La forma cristalina anhidra de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende los siguientes picos dados en grados 2-teta +/-0,2 grados: 9,1, 10,2, 11,9, 13,0, 17,1, 17,7, 18,7, 20,3, 20,8, 26,0, 26,7, 23,2, 24,1, 24,8, 29,3, 27,4 y 21,4.
3. La forma cristalina anhidra de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un espectro de difracción de rayos X como se muestra en la Figura 1.
- 10 4. La forma cristalina anhidra de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un gráfico de calorimetría diferencial de barrido como se muestra en muestra en la Figura 2.
5. Una forma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso como un producto farmacéutico.
6. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y uno o más agentes terapéuticamente activos.
- 15 7. Una forma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos que están mediados por la actividad de las enzimas PI3K, preferentemente por la actividad de la isoforma PI3Kδ.
8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

20

Figura 1
Lin (Recuentos)

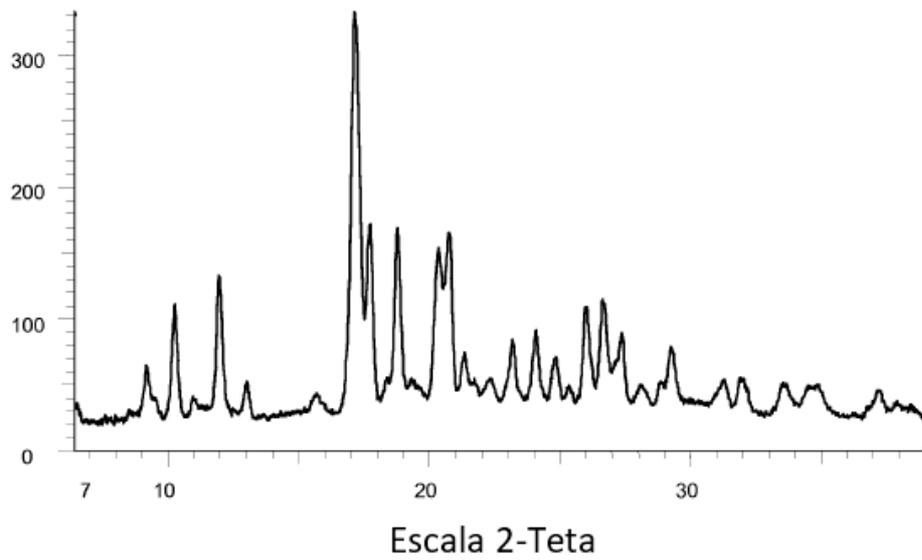


Figura 2

Flujo Térmico (W/g)

