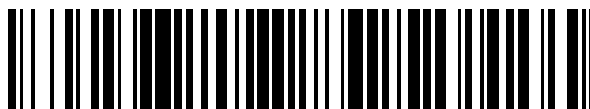


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 094**

51 Int. Cl.:

C07D 473/04 (2006.01)

A61K 31/52 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2014 PCT/IB2014/061954**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.12.2014 WO14195888**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2014 E 14732019 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 3004106**

54 Título: **Inhibidores de PI3 cinasa delta y gamma selectivos duales**

30 Prioridad:

07.06.2013 IN CH25012013

03.12.2013 IN CH55672013

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.12.2017

73 Titular/es:

RHIZEN PHARMACEUTICALS S.A. (100.0%)
Fritz Courvoisier 40
2300 La Chaux de Fonds, CH

72 Inventor/es:

VAKKALANKA, SWAROOP K. V. S.;
BHAVAR, PRASHANT K.;
VISWANADHA, SRIKANT y
BABU, GOVINDARAJULU

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 648 094 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de PI3 cinasa delta y gamma selectivos duales

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona moduladores de la proteína cinasa PI3K delta (δ) y gamma (γ) duales, métodos para prepararlos, composiciones farmacéuticas que los contienen y su uso en métodos de tratamiento, prevención y/o mejora de enfermedades o trastornos mediados por la cinasa PI3K.

10 Antecedentes de la invención

La fosfoinosítido-3 cinasa (PI3K) pertenece a una clase de cinasas lipídicas intracelulares que fosforilan el grupo hidroxilo en posición 3 del anillo de inositol de lípidos de fosfoinosítido (PI) que generan segundos mensajeros lipídicos. Mientras que las isoformas alfa y beta son ubicuas en su distribución, la expresión de delta y gamma se restringe a las células hematógenas circulantes y a las células endoteliales. A diferencia de PI3K-alfa o beta, los ratones que carecen de expresión de gamma o delta no muestran ningún fenotipo adverso que indique que la dirección a estas isoformas específicas no dé como resultado una toxicidad manifiesta.

Recientemente, los inhibidores dirigidos de la vía de la fosfoinosítido-3-cinasa (PI3K) se han sugerido como agentes inmunomoduladores. Este interés surge del hecho de que la vía de PI3K sirve para múltiples funciones en la señalización de células inmunitarias, principalmente a través de la generación de (3,4,5)-trisfosfato de fosfatidilinositol (PIP3), un segundo mensajero unido a la membrana. El PIP3 recluta proteínas al lado citoplásmico de la bicapa lipídica, incluyendo proteínas cinasas y GTPasas, iniciando una compleja red de cascadas de señalización corriente abajo importantes en la regulación de la adhesión, migración, y comunicación célula-célula de células inmunitarias.

Las cuatro isoformas de PI3K de clase I difieren considerablemente en su distribución en tejidos. La PI3K α y PI3K β son ubicuas y se activan corriente abajo de tirosina cinasas receptoras (RTK), mientras que PI3K δ y PI3K γ se limitan principalmente a células hematopoyéticas y endoteliales, y se activan corriente abajo de RTK y receptores acoplados a proteína G (GPCR), respectivamente. Los estudios genéticos en ratón han revelado que PI3K α y PI3K β son esenciales para el desarrollo normal, mientras que la pérdida de PI3K y/o PI3K γ produce descendencia viable con déficits inmunitarios selectivos.

El patrón de expresión y funciones de PI3K δ y PI3K γ han generado mucho interés en el desarrollo de inhibidores de PI3K δ /y como agentes para muchas enfermedades, incluyendo la artritis reumatoide, alergias, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y esclerosis múltiple (Hirsch et al., *Pharmacol. Ther.*, 118, 192–205, 2008; Marone et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1784, 159–185, 2008; Rommel et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 191–201, 2007; Ruckle et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5, 903–918, 2006). Los estudios que utilizan métodos tanto farmacológicos como genéticos han mostrado que estas dos isoformas con frecuencia demuestran interacciones sinérgicas entre sí (Konrad et al., *J. Biol. Chem.*, 283, 33296–33303, 2008; Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441–451, 2002). En los mastocitos, por ejemplo, la PI3K δ es esencial para la desgranulación en respuesta a la reticulación de IgE de receptores Fc (Ali et al., *J. Immunol.*, 180, 2538–2544, 2008), pero la PI3K γ desempeña un papel importante en la amplificación de la respuesta (Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441–451, 2002). Efectos similares se han visto en otras funciones celulares, incluyendo la migración de linfocitos y el estallido respiratorio de neutrófilos donde la PI3K γ desempeña un papel crítico y la PI3K δ amplifica cada proceso. Los papeles no redundantes pero relacionados de PI3K δ y PI3K γ han hecho que sea difícil determinar a cuál de las dos isoformas (solas o en combinación) es mejor dirigirse en un trastorno inflamatorio particular. Los estudios que utilizan ratones que carecen de PI3K δ y/o PI3K γ o expresan variantes con cinasa inactivada de PI3K δ y PI3K γ han sido valiosas herramientas en la comprensión de sus papeles. Por ejemplo, los ratones con genes desactivados de PI3K δ demostraron disminución de la quimiotaxis de neutrófilos, disminución de la producción de anticuerpos (tanto de linfocitos T dependientes como independientes) (Jou et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8580–8591, 2002), y menor número de células B maduras (Clayton et al., *J. Exp. Med.*, 196, 753–763, 2002; Jou et al., *Mol. Cell. Biol.*, 22, 8580–8591, 2002), y una disminución de su proliferación en respuesta a anti-IgM (Jou et al., 2002). Este fenotipo se reprodujo en la variante con cinasa inactivada PI3K δ y con inhibidores selectivos de PI3K δ junto con números disminuidos y proliferación de mastocitos, y una respuesta alérgica atenuada. La PI3K γ inactivada génicamente contenía un mayor número, pero menos sensibles, de neutrófilos, un menor número, y menos sensibles, de macrófagos y células dendríticas que mostraron una disminución de la desgranulación de mastocitos (Laffargue et al., 2002), una mayor relación de linfocitos T CD4+ a CD8+, aumento de la apoptosis de timocitos, disminución de la inducción de CXCR3 en linfocitos T activados y disminución de la contractilidad cardíaca. Este último efecto sobre el tejido cardíaco fue una preocupación para la dosificación crónica de pacientes con inhibidores de PI3K γ . Sin embargo, esta preocupación se mitigó en gran medida cuando la variante con cinasa inactivada PI3K γ (que es la que mejor imita la inhibición de la cinasa en lugar de la pérdida de la proteína) mostró fenotipos de células inmunitarias similares, pero de manera importante no tuvo defectos cardíacos. Más tarde se demostró que el efecto cardíaco se debe a los efectos de andamiaje antes que a la actividad catalítica de PI3K γ . La desactivación de PI3K δ /PI3K γ dual fue viable, pero presentó defectos graves en el desarrollo de linfocitos T y la supervivencia de timocitos. La combinación de PI3K γ desactivada génicamente/con

cinasa inactivada PI3K δ produjo un fenotipo similar lo que sugiere que al menos dentro del sistema inmunitario, es probable que el papel de PI3K δ solo sea catalítico. La interpretación de los estudios que utilizan ratones con genes desactivados y cinasa inactivada puede ser desafiante debido a que estos modelos solo proporcionan una imagen en estado estacionario del sistema inmunitario, falta el control temporal y de la dosis, y no permiten una comprensión completa de cómo una respuesta inmunitaria dinámica reaccionará a la inhibición reversible. Los inhibidores selectivos con perfiles variables (PI3K δ , PI3K γ , y PI3K δ/γ) son necesarios para los estudios de la señalización de leucocitos con el fin de evaluar las contribuciones relativas de cada PI3K a la activación de células inmunitarias (Olusegun et al., *Chemistry & Biology*, 1, 123-134 (2010), incluyendo las referencias citadas en la misma).

La inhibición dual de δ/γ está fuertemente implicada como una estrategia de intervención en la inflamación alérgica y no alérgica de las vías respiratorias y otras enfermedades autoinmunitarias. La evidencia científica de la participación de PI3K- δ y γ en diversos procesos celulares que subyacen el asma y la EPOC deriva de estudios de inhibidores y enfoques de dirección génica. Además, la resistencia a las terapias convencionales tales como corticosteroides en varios pacientes con EPOC se ha atribuido a una sobreexpresión de la vía de PI3K δ/γ . La interrupción de la señalización de PI3K- δ/γ , por tanto, proporciona una nueva estrategia destinada a contrarrestar la respuesta inmuno-inflamatoria. Debido al papel fundamental desempeñado por PI3K- δ y γ en la mediación de la funcionalidad de células inflamatorias tales como la migración y activación de leucocitos, y desgranulación de mastocitos, el bloqueo de estas isoformas también puede ser una estrategia eficaz para el tratamiento de la artritis reumatoide. Dada la importancia establecida de estas isoformas en la vigilancia inmunitaria, se esperaría que los inhibidores específicamente dirigidos a las isoformas δ y γ atenuaran la progresión de la respuesta inmunitaria encontrada en la inflamación de las vías respiratorias y la artritis reumatoide (William et al. *Chemistry & Biology*, 17, 123-134, 2010 and Thompson, et al. *Chemistry & Biology*, 17:101-102, 2010).

Se han proporcionado revisiones y estudios relativos a PI3K y vías de la proteína cinasa relacionadas por Liu et. al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 627-644, 2009; Nathan T. et. al., *Mol Cancer Ther.*, 8(1), 2009; Marone et. al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1784, 159-185, 2008 y Markman et. al., *Annals of Oncology Advance Access*, publicada en agosto de 2009. Del mismo modo, se han proporcionado revisiones y estudios relativos al papel de la PI3K δ y γ por William et. al., *Chemistry & Biology*, 17, 123-134, 2010 y Timothy et. al. *J. Med. Chem.*, 55 (20), 8559–8581, 2012. Todas estas divulgaciones de literatura se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los compuestos tales como IPI-145 y CAL130 se han notificado como inhibidores duales de PI3K δ/γ . IPI-145 está en investigación clínica para el cáncer, el asma y la artritis reumatoide. Se ha notificado que el IPI-45 tiene una dosis máxima tolerada (DMT) de 75 mg dos veces al día (55th ASH® Annual Meeting New Orleans-LA, 7-10 de diciembre de 2013). No hay informes de que CAL-130 se esté investigando con fines clínicos.

Todavía hay una necesidad insatisfecha de moduladores de PI3K δ/γ duales para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados a acontecimientos mediados por cinasas PI3K δ/γ .

Se hace referencia, además, en el presente documento a las Publicaciones Internacionales N.º WO 11/055215 y WO 12/151525 y Publicaciones de los Estados Unidos N.º 2011/0118257 y 2012/0289496, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

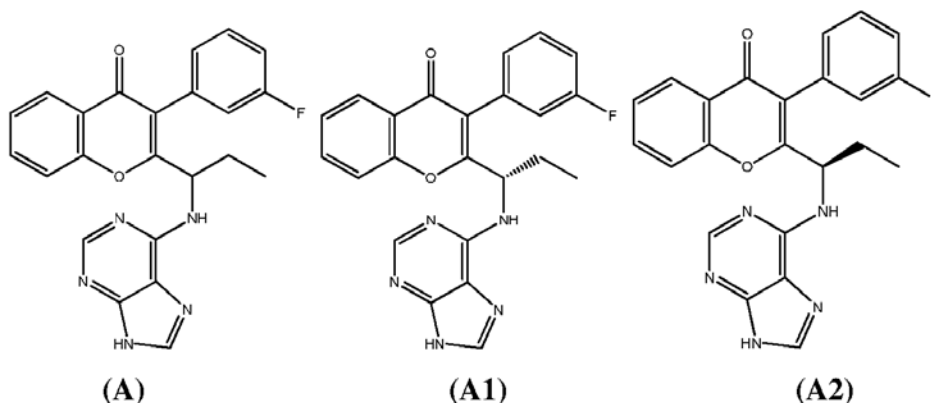
Sumario de la invención

La presente invención se refiere a inhibidores duales selectivos de proteínas cinasas PI3K delta y gamma. Estos compuestos son adecuados para su uso en una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada a PI3K, por ejemplo, una enfermedad proliferativa tal como cáncer. La inhibición de proteínas cinasas tanto PI3K delta como gamma puede proporcionar efectos beneficiosos en el tratamiento de ciertas enfermedades y trastornos.

Los inhibidores duales selectivos de la presente invención incluyen los siguientes compuestos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y profármacos de los mismos:

- (RS)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona. (Compuesto A)
- (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona. (Compuesto A1)
- (R)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona. (Compuesto A2)

Las estructuras químicas de los compuestos de la presente invención se muestran a continuación.



En una realización, la presente invención se refiere al compuesto (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está sustancialmente libre (por ejemplo, contiene menos de aproximadamente el 10 %, tal como menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 2,5 %, menos de aproximadamente el 1 %, menos de aproximadamente el 0,1 % en peso) o está libre de (R)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra realización, el compuesto (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tiene un exceso enantiomérico de más de aproximadamente el 90 %, tal como más de aproximadamente el 91 %, más de aproximadamente el 92 %, más de aproximadamente el 93 %, más de aproximadamente el 94 %, más de aproximadamente el 95 %, más de aproximadamente el 96 %, más de aproximadamente el 97 %, más de aproximadamente el 98 %, más de aproximadamente el 99 %, más de aproximadamente el 99,5 %, más de aproximadamente el 99,9 %, o más de aproximadamente el 99,99 %.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al compuesto (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (Compuesto A1).

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la presente invención (tal como el Compuesto A1) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes activos adicionales (tales como agentes antineoplásicos y los agentes activos que se analizan a continuación). En una realización, la composición farmacéutica incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

Otra realización es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en la inhibición de PI3K delta y gamma en un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención.

Otra realización más es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento, la prevención y/o la inhibición de una enfermedad, trastorno o afección mediada por la proteína cinasa PI3K (tal como cáncer u otra enfermedad o trastorno proliferativo).

Otra realización más de la presente invención es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en la inhibición de PI3K, en particular, cinasa PI3K delta y gamma en un paciente mediante la administración al paciente de una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención.

Otra realización más de la presente invención es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, autoinmunitaria o proliferativa a través de la modulación de una proteína cinasa (tal como PI3 cinasa delta y gamma) administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención. En una realización, el compuesto de la presente invención inhibe la proteína cinasa PI3K tanto delta como gamma.

Otra realización más de la presente invención es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, autoinmunitaria o proliferativa a través de la modulación de una proteína cinasa (tal como PI3 cinasa delta y gamma) administrando a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención, en combinación (simultánea o secuencialmente) con al menos otro agente anti-inflamatorio, inmunomodulador o antineoplásico (o una combinación de los mismos). En una realización, el compuesto de la presente invención inhibe la proteína cinasa PI3K tanto delta como gamma.

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres, incluyendo, pero no limitados a:

- 5 carcinoma, incluyendo, pero no limitado a, el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón microcítico, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides, próstata, y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas;
- 10 tumores hematopoyéticos de linaje linfoide, incluyendo, pero no limitados a, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett;
- tumores hematopoyéticos de linaje mieloide, incluyendo, pero no limitados a, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica;
- 15 tumores de origen mesenquimal, incluyendo, pero no limitados a, fibrosarcoma y rhabdomyosarcoma;
- tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo, pero no limitados a, astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; y
- 20 otros tumores, incluyendo, pero no limitados a, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi.

En una realización, los compuestos de la presente invención se administran para tratar una leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma de Burkett, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica.

Debido al papel clave de las proteínas cinasas en la regulación de la proliferación celular en general, los inhibidores de proteína cinasa de la presente invención podrían actuar como agentes citostáticos reversibles, y pueden ser útiles por tanto en el tratamiento de cualquier proceso de enfermedad que presente una proliferación celular anormal, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, poliposis adenomatosa familiar, neurofibromatosis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, psoriasis, glomerulonefritis, reestenosis después de angioplastia o cirugía vascular, formación de cicatriz hipertrófica, enfermedad inflamatoria intestinal, rechazo de trasplantes, choque endotóxico, e infecciones por hongos.

Los compuestos de la presente invención como moduladores de la apoptosis son útiles en el tratamiento del cáncer (incluyendo pero no limitado a los tipos mencionados anteriormente en el presente documento), infecciones víricas (incluyendo, pero no limitadas a, virus del herpes, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus de Sindbis y adenovirus), enfermedades autoinmunitarias (incluyendo, pero no limitadas, a lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis mediada autoinmunitaria, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal, y diabetes mellitus autoinmunitaria), trastornos neurodegenerativos (incluyendo, pero no limitados a, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar), síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, lesión isquémica asociada a infartos de miocardio, apoplejía y lesión por reperfusión, arritmia, aterosclerosis, o enfermedades hepáticas relacionadas con el alcohol o inducidas por toxinas, enfermedades hemáticas (incluyendo, pero no limitado a, anemia crónica y anemia aplásica), enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético (incluyendo, pero no limitadas a, osteoporosis y artritis), rinosinusitis sensible a la aspirina, fibrosis quística, esclerosis múltiple, enfermedades renales y dolor por cáncer. Los compuestos de la presente invención también son útiles en la prevención, inhibición o la supresión del desarrollo del SIDA en individuos infectados con VIH.

Los compuestos de la presente invención pueden modular el nivel de síntesis de ARN y ADN celular. Estos agentes son, por tanto, útiles en el tratamiento de infecciones víricas, incluyendo, pero no limitadas a, VIH, virus del papiloma humano, virus del herpes, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus de Sindbis y adenovirus.

Los compuestos de la presente invención son útiles en la quimioprevención del cáncer. La quimioprevención se define como la inhibición del desarrollo de cáncer invasivo ya sea bloqueando el acontecimiento mutagénico iniciador o bloqueando la progresión de células pre-malignas que ya han sufrido una agresión o inhibición de la recaída del tumor. Los compuestos de la presente invención también son útiles en la inhibición de la angiogénesis tumoral y metástasis. Una realización de la invención es un método para inhibir la angiogénesis tumoral o metástasis en un paciente que necesite el mismo mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

Otra realización de la presente invención es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario (por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria), una enfermedad o trastorno que implica inflamación (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, glomerulonefritis, enfermedades

neuroinflamatorias, esclerosis múltiple, uveítis y trastornos del sistema inmunitario), cáncer u otra enfermedad proliferativa, una enfermedad o trastorno hepático, una enfermedad o trastorno renal. El uso incluye la administración de una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

- 5 Los ejemplos de trastornos inmunitarios incluyen, pero no se limitan a, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, enfermedad inflamatoria intestinal, dermatitis, osteoartritis, asma, enfermedad inflamatoria muscular, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, escleroderma, osteoporosis, eccema, rechazo de injertos de trasplante alógeno o xenógeno (órganos, médula ósea, células madre y otras células y tejidos), enfermedad de injerto contra hospedador, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria, diabetes de tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, síndrome de
- 10 Sjogren, tiroiditis (por ejemplo, tiroiditis de Hashimoto y autoinmunitaria), miastenia grave, anemia hemolítica autoinmunitaria, esclerosis múltiple, fibrosis quística, hepatitis crónica recidivante, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica.

- En una realización, los compuestos descritos en el presente documento son útiles como inmunosupresores para
- 15 prevenir rechazos de injerto de trasplantes, o rechazo de trasplante alógeno o xenógeno (órganos, médula ósea, células madre, otras células y tejidos), y enfermedad de injerto contra hospedador. En otras realizaciones, los rechazos de injerto de trasplantes son resultado de trasplantes de tejidos u órganos. En otras realizaciones, la enfermedad de injerto contra huésped de injerto es resultado del trasplante de médula ósea o células madre. Una realización es un método para prevenir o reducir el riesgo de rechazo del injerto de trasplante, rechazo del trasplante
- 20 alógeno o xenógeno (órganos, médula ósea, células madre, otras células y tejidos), o enfermedad de injerto contra hospedador mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

- Los compuestos de la presente invención también son útiles en combinación (administrados juntos o secuencialmente) con tratamientos antineoplásico conocidos, tal como radioterapia o con agentes citostáticos o
- 25 citotóxicos o antineoplásico, tales como, por ejemplo, agentes que interaccionan con el ADN, tales como cisplatino o doxorubicina; inhibidores de topoisomerasa II, tales como etopósido; inhibidores de topoisomerasa I tales como CPT-11 o topotecán; agentes de interacción de tubulina, tales como paclitaxel, docetaxel o las epotilonas (por ejemplo ixabepilona), ya sea de origen natural o sintético; agentes hormonales, tales como tamoxifeno; inhibidores de timidilato sintasa, tales como 5-fluorouracilo; y antimetabolitos, tales como metotrexato, otros inhibidores de
- 30 tirosina cinasa tales como Iressa y OSI-774; inhibidores de la angiogénesis; inhibidores de EGF; inhibidores de VEGF; inhibidores de CDK; inhibidores de SRC; inhibidores de c-Kit; inhibidores de Her1/2 y anticuerpos monoclonales dirigidos contra receptores del factor de crecimiento tales como erbitux (EGF) y herceptina (Her2) y otros moduladores de proteína cinasa también.

- 35 Los compuestos de la presente invención también son útiles en combinación (administrados juntos o secuencialmente) con uno o más fármacos anti-inflamatorios esteroides, fármacos anti-inflamatorios no esteroides (AINE) o derivados anti-inflamatorios selectivos inmunitarios (AISIm).

- La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la
- 40 presente invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más de los ingredientes activos identificados anteriormente, tales como otros agentes antineoplásicos.

- Otra realización más es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de la
- 45 leucemia en un paciente que necesita el mismo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención son eficaces para tratar la leucemia linfocítica crónica (LLC), linfoma no Hodgkin (LNH), linfoma de Hodgkin (LH), leucemia mieloide aguda (LMA), mieloma múltiple (MM), linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP) y linfoma no Hodgkin indolente (LNH-I).

- 50 Otra realización más es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de la leucemia en un paciente que necesita el mismo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. Por ejemplo, los compuestos de la presente invención son eficaces para tratar trastornos autoinmunitarios, tales como asma, EPOC, artritis reumatoide, psoriasis, lupus y encefalomiелitis
- 55 autoinmunitaria experimental (EAE).

- Otra realización más es al menos un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento de la rinitis
- alérgica en un paciente que necesita el mismo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

60

Breve descripción de las figuras

Breve descripción de las figuras

- 65 La Figura 1 representa una gráfica de barras del recuento de neutrófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (FLBA) de animales tratados con 0, 0,3, 1, 3, y 10 mg/kg de Compuesto A1 (por vía oral) de acuerdo con el

modelo de neutrofilia pulmonar inducida por lipopolisacáridos descrito en el Ensayo 7.

La Figura 2 representa una gráfica de barras del recuento de neutrófilos en el fluido de lavado peritoneal de animales tratados con 0, 1, 3, y 10 mg/kg de Compuesto A1 (por vía oral) de acuerdo con el modelo de inflamación de la bolsa de aire de rata inducida por lipopolisacáridos descrito en el Ensayo 8.

La Figura 3 representa una gráfica de barras de la concentración de TNF- α en plasma inducida por lipopolisacáridos en ratas Wistar hembras en ayunas después de la administración de 0, 1, 3, y 10 mg/kg de compuesto A1 (por vía oral) de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ensayo 9.

Las Figuras 4A y 4B representan gráficas de pausa potenciada (Ppot) o relación de FEP/FIP (flujo espiratorio pico/flujo inspiratorio pico), respectivamente, en cobayas macho sensibilizados después de la prueba de provocación con metacolina y tratados con OVA/SAL u OVA/OVA o 0,3, 1, o 3 mg/kg de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 10A.

Las Figuras 4C-4E representan gráficas de barras del recuento de eosinófilos en FLBA, recuento total de células en FLBA, y porcentaje de eosinófilos, respectivamente, en cobayas macho sensibilizados con ovoalbúmina y tratados con 0, 0,3, 1 o 3 mg/kg de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 10A.

Las Figuras 5A y 5B representan gráficas de (Ppot) o relación de FEP/FIP, respectivamente, en ratones sensibilizados con ovoalbúmina después de la prueba de provocación con metacolina y tratados con SAL/SAL, OVA/SAL u OVA/OVA o 3 mg/kg de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 10B.

Las Figuras 5C-5E representan gráficas de barras del recuento de eosinófilos en FLBA, recuento total de células en FLBA, y porcentaje de eosinófilos, respectivamente, en ratones sensibilizados con ovoalbúmina y tratados con 0 o 3 mg/kg de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 10B.

Las Figuras 6A y 6B representan gráficas de barras de las puntuaciones histopatológicas individuales para tobillo y rodilla, respectivamente, en artritis inducida por colágeno utilizando ratas Lewis tratadas con un control o 15 mg/kg/dos veces al día de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

Las Figuras 6C y 6D representan gráficas de barras de las puntuaciones histopatológicas sumadas para tobillo y rodilla, respectivamente, en el modelo de artritis inducida colágeno utilizando ratas Lewis tratadas con vehículo o 15 mg/kg/dos veces al día de Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

Las Figuras 7A y 7B representan gráficas de barras de recuentos de células de macrófagos y neutrófilos, respectivamente, en FLBA después de la administración de 0,3, 1, o 3 mg/kg/dos veces al día de Compuesto A1 en ratones Balb/c machos en un modelo de infiltración de células inducida por humo de cigarrillo como se describe en el Ensayo 15.

La Figura 8 representa una gráfica que muestra la inhibición de la fosforilación de AKT en estirpes celulares leucémicas (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, Hut-78, y HUT-102) por el Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 3.

La Figura 9 representa una gráfica que muestra la inhibición en porcentaje de células positivas CD63 inducida por fMLP o anti-Fc ϵ R1 en sangre entera humana por el Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 4.

La Figura 10 representa una gráfica que muestra la inhibición de citocinas inducidas por CD3/CD28 anti-humanas (TNF α , IFN γ e IL2) por el Compuesto A1 de acuerdo con el ensayo 6D.

Descripción detallada de la invención

Como se utilizan en el presente documento se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario. Además, muchos de los grupos definidos en el presente documento pueden estar opcionalmente sustituidos. La lista de sustituyentes en la definición es de ejemplo y no ha de interpretarse que limita los sustituyentes definidos en otra parte en la memoria descriptiva.

Algunos de los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y, por tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros, y otras formas estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-. A menos que se especifique lo contrario, las presentes entidades químicas, composiciones farmacéuticas y métodos pretenden incluir todos estos isómeros posibles, incluyendo mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas intermedias. Por ejemplo, el ejemplo no limitante de mezclas intermedias incluye una mezcla de isómeros R:S o S:R en una relación de 10:90, 13:87, 17:83, 20:80, o 22:78. Los isómeros (R)- y (S)- ópticamente activos se pueden preparar utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o se resuelven utilizando técnicas convencionales. Cuando los compuestos descritos en el presente documento contienen enlaces dobles olefínicos u otros centros de asimetría geométrica, y a menos que se especifique lo contrario, se pretende que los compuestos incluyan isómeros geométricos tanto E como Z.

El término "tautómeros" se refiere a compuestos, que se caracterizan por interconversión relativamente fácil de las formas isoméricas en equilibrio. Estos isómeros están destinados a ser cubiertos por la presente invención. Los "tautómeros" son isómeros estructuralmente distintos que se interconvierten por tautomerización. La "tautomerización" es una forma de isomerización e incluye tautomerización prototrópica o de desplazamiento de protón, que se considera un subconjunto de la química de ácido-base. La "tautomerización prototrópica" o "tautomerización de desplazamiento de protón" implica la migración de un protón acompañado de cambios en el orden de enlace, con frecuencia el intercambio de un enlace sencillo con un enlace doble adyacente. Cuando la tautomerización es posible (por ejemplo, en solución), se puede alcanzar un equilibrio químico de los tautómeros. Un ejemplo de la tautomerización es tautomerización de ceto-enol. Un ejemplo específico de la tautomerización de ceto-

enol es la interconversión de tautómeros de pentano-2,4-diona y 4-hidroxipent-3-en-2-ona. Otro ejemplo de tautomerización es la tautomerización de fenol-ceto. Un ejemplo específico de la tautomerización de fenol-ceto es la interconversión de tautómeros de piridin-4-ol y piridin-4(1H)-ona.

- 5 El término “profármaco” se refiere a un compuesto, que es un precursor inactivo de un compuesto que se convierte en su forma activa en el cuerpo mediante procesos metabólicos normales. El diseño del profármaco se analiza generalmente en Hardma, et al. (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª ed., págs. 11-16 (1996). Una discusión minuciosa se proporciona en Higuchi, et al., *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, ASCD Symposium Series, y en Roche (ed.), *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American
10 Pharmaceutical Association and Pergamon Press (1987). Para ilustrar, los profármacos se pueden convertir en una forma farmacológicamente activa a través de la hidrólisis de, por ejemplo, un enlace de éster o amida, introduciendo o exponiendo de este modo un grupo funcional en el producto resultante. Los profármacos se pueden diseñar para reaccionar con un compuesto endógeno para formar un conjugado soluble en agua que mejora adicionalmente las propiedades farmacológicas del compuesto, por ejemplo, aumento de la semivida circulatoria. Alternativamente, los
15 profármacos se pueden diseñar para someterse a modificación covalente en un grupo funcional, por ejemplo, con ácido glucurónico, sulfato, glutatona, aminoácidos, o acetato. El conjugado resultante se puede inactivar y excretar en la orina, o se hace más potente que el compuesto original. Los conjugados de alto peso molecular también se pueden excretar en la bilis, someter a escisión enzimática, y liberar de nuevo en la circulación, aumentando de este modo de manera eficaz la semivida biológica del compuesto administrado originalmente.

20 El término “éster” se refiere a un compuesto, que se forma por reacción entre un ácido y un alcohol con eliminación de agua. Un éster se puede representar por la fórmula general RCOOR' (donde R es un fármaco y R' es un grupo químico).

- 25 Adicionalmente, la presente invención también incluye los compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos, por ejemplo, el reemplazo de hidrógeno con deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por carbono enriquecida ^{13}C o ^{14}C .

30 Los compuestos de la presente invención también pueden contener proporciones no naturales de isótopos atómicos en uno o más de los átomos que constituyen dichos compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden ser radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como por ejemplo tritio (^3H), yodo-125 (^{125}I) o carbono-14 (^{14}C). Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sea radiactivos o no, se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

- 35 Las sales farmacéuticamente aceptables que forman parte de esta invención incluyen sales derivadas de bases inorgánicas tales como Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, y Mn; sales de bases orgánicas tales como N,N'-diacetiltilendiamina, glucamina, trietilamina, colina, hidróxido, diciclohexilamina, metformina, bencilamina, trialquilamina, y tiamina; bases quirales tales como alquilfenilamina, glicinol, y fenil glicinol; sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina,
40 prolina, hidroxil prolina, histidina, ornitina, lisina, arginina, y serina; sales de amonio cuaternario de los compuestos de invención con haluros de alquilo, sulfatos de alquilo tales como MeI y $(\text{Me})_2\text{SO}_4$; aminoácidos no naturales tales como isómeros D o aminoácidos sustituidos; guanidina; y guanidina sustituida en donde los sustituyentes se seleccionan de nitro, amino, alquilo, alquenoilo, alquinilo, amonio o sales de amonio y sales de aluminio sustituidas. Las sales pueden incluir sales de adición de ácido cuando sea apropiado, que pueden ser sulfatos, nitratos, fosfatos,
45 percloratos, boratos, hidrohaluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, fumaratos, succinatos, palmoatos, metansulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencensulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos, y cetoglutaratos.

50 Cuando se utilizan intervalos en el presente documento para las propiedades físicas, tales como el peso molecular, o propiedades químicas, tales como fórmulas químicas, todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y realizaciones específicas en el presente documento tienen por objeto estar incluidas. El término “aproximadamente” cuando se hace referencia a un número o un intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico al que se hace referencia es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico), y por tanto el número o intervalo numérico puede variar, por ejemplo, de entre el 1 % y el 15 % del número o intervalo numérico establecido. La expresión “que comprende” (y expresiones
55 relacionadas, tales como “comprenden” o “comprende” o “que tiene” o “que incluye”) incluye aquellas realizaciones, por ejemplo, una realización de cualquier composición de la materia, composición, método o proceso, o similares, que “consiste en” “consiste esencialmente en las características descritas”.

60 Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados en todas partes: PI3-K = fosfoinosítido 3-cinasa; PI = fosfatidilinositol; SIDA = Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; VIH = Virus de Inmunodeficiencia Humana; MeI = yoduro de metilo; ND: No determinado.

Las abreviaturas utilizadas en el presente documento tienen su significado convencional dentro de las técnicas químicas y biológicas.

65 La expresión “proliferación celular” se refiere a un fenómeno por el cual el número de células ha cambiado como

resultado de la división. Esta expresión también abarca el crecimiento celular por el cual la morfología celular ha cambiado (por ejemplo, aumento de tamaño) coherente con una señal proliferativa.

- La expresión “co-administración”, “administrado en combinación con”, y sus equivalentes gramaticales, como se utiliza en el presente documento, abarcan la administración de dos o más agentes a un animal de modo que ambos agentes y/o sus metabolitos están presentes en el animal al mismo tiempo. La co-administración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en momentos diferentes en composiciones separadas, o la administración en una composición en la que ambos agentes están presentes.
- La expresión “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a aquella cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es suficiente para efectuar la aplicación prevista, incluyendo, pero no limitada al tratamiento de la enfermedad, como se define a continuación. La cantidad terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la aplicación prevista (in vitro o in vivo), o del sujeto o la afección de la enfermedad que se está tratando, por ejemplo, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la afección de la enfermedad, la manera de administración y similares, que se pueden determinar fácilmente por un experto habitual en la materia. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana, por ejemplo, reducción de la adhesión de plaquetas y/o migración celular. La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación que se ha de seguir, si se administra en combinación con otros compuestos, sincronización de la administración, el tejido al que se administra, y el sistema de administración físico en el que se transporta.

- Como se utilizan en el presente documento, “tratamiento”, “tratando” o “mejorando” se utilizan indistintamente. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo, pero no limitados a, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que está siendo tratado. Además, un beneficio terapéutico se logra con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados al trastorno subyacente de manera que se observa una mejora en el paciente, a pesar de que el paciente todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones se pueden administrar a un paciente en riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, a pesar de que puede no haberse hecho un diagnóstico de esta enfermedad.

- Un “efecto terapéutico”, como se utiliza ese término en el presente documento, abarca un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico como se ha descrito anteriormente. Un efecto profiláctico incluye retrasar o eliminar la aparición de una enfermedad o afección, retrasando o eliminando el comienzo de los síntomas de una enfermedad o afección, ralentizando, deteniendo, o invirtiendo la progresión de una enfermedad o afección, o cualquier combinación de los mismos.

- El término “sujeto” o “paciente” se refiere a un animal (por ejemplo, un perro, gato, caballo o cerdo), tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en aplicaciones tanto terapéuticas humanas como veterinarias. En algunas realizaciones, el paciente es un mamífero, y en algunas realizaciones, el paciente es un ser humano.

- “Terapia con radiación” significa exponer a un paciente, utilizando métodos habituales y composiciones conocidas por el profesional, a emisores de radiación, tales como radionúclidos emisores de partículas alfa (por ejemplo, radionúclidos de actinio y torio), emisores de radiación de baja transferencia lineal de energía (TLE) (es decir, emisores beta), emisores de electrones de conversión (por ejemplo, estroncio-89 y samario-153-EDTMP) o radiación de alta energía, incluyendo, sin limitación, rayos X, rayos gamma y neutrones.

- “La transducción de señal” es un proceso durante el cual las señales estimuladoras o inhibitoras se transmiten hacia y dentro de una célula para provocar una respuesta intracelular. Un modulador de una vía de transducción de señal se refiere a un compuesto que modula la actividad de una o más proteínas celulares cartografiadas a la misma vía de transducción de señal específica. Un modulador puede aumentar (agonista) o suprimir (antagonista) la actividad de una molécula de señalización.

- La expresión “inhibición selectiva” o “inhibir selectivamente” como se aplica a un agente biológicamente activo se refiere a la capacidad del agente para reducir selectivamente actividad de señalización objetivo en comparación con la actividad de señalización fuera de objetivo, a través de la interacción directa o indirecta con el objetivo.

- La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente farmacéuticamente aceptable” incluye, pero no se limita a, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, uno o más diluyentes adecuados, cargas, sales, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, agentes humectantes, matrices de liberación controlada, colorantes/aromatizantes, vehículos, excipientes, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y combinaciones de los mismos. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas de la invención. Los ingredientes activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

En ciertas realizaciones, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento se unirán específicamente a una PI3 cinasa o una proteína cinasa seleccionada entre el grupo que consiste en mTOR, proteína cinasa dependiente de ADN (número de acceso de proteína Pubmed (PPAN) AAA79184), Abl tirosina cinasa (CAA52387), Bcr-Abl, cinasa de células hematopoyéticas (PPAN CAI19695), Src (PPAN CAA24495), receptor 2 del factor de crecimiento vascular endotelial (PPAN ABB82619), receptor del factor de crecimiento epidérmico (PPAN AG43241), receptor B4 de EPH (PPAN EAL23820), receptor del factor de células madre (PPAN AAF22141), receptor TIE-2 de proteína tirosina cinasa (PPAN Q02858), tirosina cinasa 3 relacionada con fms (PPAN NP_004110), receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PPAN NP_990080), RET (PPAN CAA73131), y cualesquiera otras proteínas cinasas relacionadas, así como cualesquiera mutantes funcionales de los mismos.

En otras realizaciones, la CI_{50} de un compuesto descrito en el presente documento para pi 10 α , pi 10 β , pi 10 γ , o pi 10 δ es menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de 1 nM o menos de aproximadamente 0,5 nM. En algunas realizaciones, la CI_{50} de un compuesto descrito en el presente documento para mTor es menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de 1 nM o menos de aproximadamente 0,5 nM. En algunas otras realizaciones, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento presentan especificidad de unión dual y son capaces de inhibir una PI3 cinasa (por ejemplo, una PI3 cinasa clase I), así como una proteína cinasa (por ejemplo, mTOR) con un valor de CI_{50} de menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nm, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de 1 nM o menos de aproximadamente 0,5 nM.

En realizaciones adicionales, los compuestos de la presente invención presentan una o más características funcionales descritas en el presente documento. Por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento se unen específicamente a una PI3 cinasa. En algunas realizaciones, la CI_{50} de un compuesto descrito en el presente documento para pi 10 α , pi 10 β , pi 10 γ , o pi 10 δ es menos de aproximadamente 1 μ M, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 10 nM, menos de aproximadamente 1 nM, menos de aproximadamente 0,5 nM, menos de aproximadamente 100 pM, o menos de aproximadamente 50 pM.

En otras realizaciones, los compuestos de la presente invención inhiben selectivamente uno o más miembros de fosfatidilinositol 3-cinasas (PI3-cinasa) tipo I o clase I con un valor de CI_{50} de aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, o aproximadamente 1 pM o menos como se mide en un ensayo de cinasa *in vitro*.

En otro aspecto más, un inhibidor que inhibe selectivamente uno o más miembros de PI3-cinasas tipo I, o un inhibidor que inhibe selectivamente una o más vías de señalización mediadas por PI3-cinasa tipo I, alternativamente se puede entender que se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibidora del 50 % (CI_{50}) con respecto a una PI3-cinasa tipo I determinada, que es al menos 10 veces menor, al menos 20 veces menor, al menos 50 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 1000 veces menor que la CI_{50} del inhibidor con respecto al resto de las otras PI3-cinasas tipo I.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "inhibidor de PI3-cinasa δ/γ dual" e "inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ dual" se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la isoenzima de PI3-cinasa tanto δ como γ más eficazmente que otras isoenzimas de la familia de PI3K. Un inhibidor de PI3-cinasa δ/γ dual, por tanto, es más selectivo para PI3-cinasa δ y γ que los inhibidores de PI3K convencionales, tales como CAL-130, wortmanina y LY294002, que son inhibidores de PI3K no selectivos.

La inhibición de la PI3-cinasa δ y γ puede ser de beneficio terapéutico en el tratamiento de diversas afecciones, por ejemplo, afecciones caracterizadas por una respuesta inflamatoria incluyendo, pero no limitadas a, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades alérgicas y enfermedades artríticas. De manera importante, la inhibición de la función de PI3-cinasa δ y γ no parece afectar las funciones biológicas tales como la viabilidad y fertilidad.

"Respuesta inflamatoria" como se utiliza en el presente documento se caracteriza por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor (es decir, inflamación) y normalmente implica lesión o destrucción de tejidos. Una respuesta inflamatoria es por lo general una respuesta protectora localizada provocada por lesión o destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o separar (secuestrar) tanto el agente perjudicial como el tejido lesionado. Las respuestas inflamatorias se asocian notablemente al influjo de leucocitos y/o quimiotaxis de leucocitos (por ejemplo, neutrófilos). Las respuestas inflamatorias pueden ser resultado de la infección con organismos y virus patógenos, medios no infecciosos tales como traumatismo o reperfusión después de un infarto de miocardio e ictus, respuestas inmunitarias a antígenos extraños, y enfermedades autoinmunitarias. Las respuestas inflamatorias susceptibles de tratamiento con los métodos y compuestos de acuerdo con la invención abarcan afecciones asociadas a reacciones del sistema de defensa específico, así como las afecciones asociadas a reacciones del sistema de defensa no específico.

La invención incluye un compuesto de acuerdo con las reivindicaciones para su uso en la mejora de las afecciones asociadas a la activación de células inflamatorias. "Activación celular inflamatoria" se refiere a la inducción por un estímulo (incluyendo pero no limitado a, citocinas, antígenos o auto-anticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo pero no limitados a las citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoides, o aminas vasoactivas), o la expresión de la superficie celular de números nuevos o aumentados de mediadores (incluyendo pero no limitados a, antígenos de histocompatibilidad principales o moléculas de adhesión celular) en las células inflamatorias (incluyendo pero no limitado a los monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (leucocitos polimorfonucleares incluyendo neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Se apreciará por los expertos en la materia que la activación de uno o una combinación de estos fenotipos en estas células puede contribuir a la iniciación, perpetuación o exacerbación de una afección inflamatoria.

"Enfermedad autoinmunitaria" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión del tejido se asocia a respuestas humorales o mediadas por células a los constituyentes propios del cuerpo.

"Rechazo de trasplante" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier respuesta inmunitaria dirigida contra el tejido injertado (incluyendo órganos o células (por ejemplo, médula ósea), caracterizada por una pérdida de la función de los tejidos injertados y circundantes, dolor, hinchazón, leucocitosis y trombocitopenia).

"Enfermedad alérgica", como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquier síntoma, daño al tejido, o pérdida de la función del tejido resultante de la alergia.

"Enfermedad artrítica" como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad que se caracteriza por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a una diversidad de etiologías.

"Dermatitis" como se utiliza en el presente documento se refiere a cualquiera de una gran familia de enfermedades de la piel que se caracterizan por la inflamación de la piel atribuible a una diversidad de etiologías.

Como se ha descrito anteriormente, la expresión "inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ dual" generalmente se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la isoenzima de PI3-cinasa δ y γ de manera más eficaz que otras isoenzimas de la familia de PI3K. Las eficacias relativas de los compuestos como inhibidores de una actividad enzimática (u otra actividad biológica) se pueden establecer determinando las concentraciones a las que cada compuesto inhibe la actividad a un grado predefinido y después comparando los resultados. Normalmente, la determinación preferida es la concentración que inhibe el 50 % de la actividad en un ensayo bioquímico, es decir, la concentración inhibidora del 50 % o "CI₅₀". Las determinaciones de CI₅₀ se pueden realizar utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En general, una CI₅₀ se puede determinar midiendo la actividad de una enzima dada en la presencia de un intervalo de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores obtenidos experimentalmente de la actividad enzimática después se grafican contra las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra del 50 % de actividad enzimática (en comparación con la actividad en la ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor de CI₅₀. Análogamente, otras concentraciones inhibidoras se pueden definir mediante determinaciones adecuadas de actividad. Por ejemplo, en algunos entornos puede ser deseable establecer una concentración inhibidora del 90 %, es decir, CI₉₀, etc.

En consecuencia, como alternativa puede entenderse que un inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ dual se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibidora del 50 % (CI₅₀) con respecto a la PI3-cinasa δ y γ , que es al menos 10 veces menor, al menos 20 veces menor, o al menos 30 veces menor que el valor de CI₅₀ con respecto a cualquiera o todos los otros miembros de la familia de PI3K clase I. En una realización alternativa de la invención, puede entenderse que la expresión inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ dual se refiere a un compuesto que presenta una CI₅₀ con respecto a la PI3-cinasa δ y γ que es al menos 30 veces menor, al menos 50 veces menor, al menos 100 veces menor, al menos 200 veces menor, o al menos 500 veces menor que la CI₅₀ con respecto a cualquiera o todos los otros miembros de la familia de PI3K clase I. Un Inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ dual se administra normalmente en una cantidad de manera que inhibe selectivamente la actividad de PI3-cinasa tanto δ como γ , como se ha descrito anteriormente.

En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención presentan inhibición de PI3-cinasa δ y γ casi igualmente (~ 1:1) o a una relación máxima de 1:5, es decir, el compuesto de la presente invención presenta valores de CI₅₀ casi iguales para la enzima PI3-cinasa tanto δ como γ , o a lo sumo una diferencia de 3 a 8 veces entre los dos.

Los métodos de la invención pueden aplicarse a poblaciones de células in vivo o ex vivo. "In vivo" significa dentro de un individuo vivo, como dentro de un animal o humano o en un cuerpo del sujeto. En este contexto, los métodos de la invención se pueden utilizar terapéutica o profilácticamente en un individuo. "Ex vivo" o "in vitro" significa fuera de un individuo vivo. Los ejemplos de poblaciones de células ex vivo incluyen cultivos celulares *in vitro* y muestras biológicas, incluyendo, pero no limitadas a, muestras de fluido o tejido obtenidas de individuos. Dichas muestras se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Las muestras de fluido biológico de ejemplo incluyen sangre,

líquido cefalorraquídeo, orina y saliva. Las muestras de tejido de ejemplo incluyen tumores y biopsias de los mismos. En este contexto, la invención se puede utilizar para una diversidad de propósitos, incluyendo propósitos terapéuticos y experimentales. Por ejemplo, la invención se puede utilizar *ex vivo* o *in vitro* para determinar el programa y/o dosificación de administración óptimos de un inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ para una indicación

- 5 dada, tipo de célula, individuo, y otros parámetros. La información obtenida de dicho uso se puede utilizar para propósitos experimentales o de diagnóstico o en la clínica para establecer protocolos para el tratamiento *in vivo*. Se describen a continuación otros usos *ex vivo* para los cuales la invención puede ser adecuada o serán evidentes para los expertos en la materia.
- 10 Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en las Publicaciones Internacionales N.º WO 2011/055215, WO 2012/151525 y WO 2013/164801, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Composiciones farmacéuticas

- 15 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la presente invención y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. En una realización, la composición farmacéutica incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. La composición farmacéutica puede incluir uno o más ingredientes activos adicionales como se describe en el presente
- 20 documento.

Los vehículos y/o excipientes farmacéuticos se pueden seleccionar entre diluyentes, cargas, sales, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, sustancias de deslizamiento, agentes humectantes, matrices de liberación controlada, colorantes, aromatizantes, tampones, estabilizantes, solubilizantes, y combinaciones de los mismos.

- 25 En una realización, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento contienen de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1000 mg, tal como de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.000 mg o de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 800 mg o de 50 mg a aproximadamente 600 mg o de 50 mg a aproximadamente 600 mg de uno o más compuestos de la presente invención, de 100 mg a
- 30 aproximadamente 400 mg de uno o más compuestos de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar solas o en combinación con uno o más de otros agentes activos. Cuando se desee, los compuestos sujeto y otro agente o agentes se pueden mezclar en una preparación o ambos componentes se pueden formular en preparaciones separadas para usarlos en

35 combinación por separado o al mismo tiempo.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía que permita la administración de los compuestos al sitio de acción, tal como por vía oral, intranasal, tópica (por ejemplo, por vía transdérmica), intraduodenal, parenteral (incluyendo intravenosa, intraarterial, intramuscular,

40 intravascular, intraperitoneal o por inyección o infusión), intradérmica, intramamaria, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar (por ejemplo, fármacos en aerosol) o subcutánea (incluyendo la administración en depósito para la liberación a largo plazo, por ejemplo, incrustado bajo la cápsula esplénica, cerebro o en la córnea), sublingual, anal, rectal, vaginal, o mediante implantación quirúrgica (por ejemplo, incrustado bajo la cápsula

45 esplénica, cerebro o en la córnea).

Las composiciones se pueden administrar en forma sólida, semi-sólida, líquida o gaseosa, o pueden estar en polvo seco, tal como en forma liofilizada. Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar en formas convenientes para suministro, incluyendo, por ejemplo, formas de dosificación sólidas tales como cápsulas, sobres, obleas, gelatinas, papeles, tabletas, supositorios, gránulos, píldoras, trociscos y grageas. El tipo de envase generalmente

50 dependerá de la ruta de administración deseada. Las formulaciones de liberación sostenida implantables también se contemplan, como lo son las formulaciones transdérmicas.

Métodos de tratamiento

- 55 La cantidad del compuesto que se ha de administrar depende del mamífero que se trata, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición del compuesto y la discreción del médico prescriptor. Sin embargo, una dosificación eficaz está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis únicas o divididas. Para un ser humano de 70 kg, esto ascendería a aproximadamente 0,05 a 7 g/día, preferentemente de
- 60 aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención se puede administrar ya sea en dosis únicas o múltiples (por ejemplo, dos veces o tres veces al día).

Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en combinación con uno o más de los agentes antineoplásicos (por ejemplo, agentes quimioterápicos), anticuerpos terapéuticos, y tratamiento con radiación.

- 65 Los compuestos de la invención se pueden formular o administrar junto con otros agentes que actúan para aliviar los

síntomas de afecciones inflamatorias tales como encefalomielitis, asma, y otras enfermedades descritas en el presente documento. Estos agentes incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE).

Ejemplos

5

Los ejemplos y preparaciones proporcionados a continuación ilustran y ejemplifican adicionalmente los compuestos de la presente invención y los métodos de preparación de dichos compuestos. Ha de entenderse que el alcance de la presente invención no se limita en modo alguno por el alcance de los siguientes ejemplos y preparaciones. En los siguientes ejemplos, las moléculas con un centro quiral único, a menos que se indique lo contrario, existen como una mezcla racémica. Esas moléculas con dos o más centros quirales, a menos que se indique lo contrario, existen como una mezcla racémica de diastereómeros. Los enantiómeros/diastereómeros únicos se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la materia.

10

Como se utiliza en el presente documento, el superíndice 1 se refiere a la Publicación Internacional N.º WO 11/055215 y el superíndice 2 se refiere a la Publicación Internacional N.º WO 12/151525. Estas referencias describen cómo se preparan diversos intermedios.

15

Intermedios

20

Intermedio 1: 3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxipropil)-4H-cromen-4-ona: A una solución de 2-(1-bromopropil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona¹ (8,80 g, 24,36 mmol) en DMSO (85 ml), se le añadió n-butanol (5 ml) y se calentaron a 120 °C durante 3 h. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente (TA), se inactivó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (2,10 g, 29 %) que se utilizó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

25

Intermedio 2: 3-(3-fluorofenil)-2-propionil-4H-cromen-4-ona: Se añadió DMSO (1,90 ml, 26,82 mmol) a diclorometano (70 ml) y se enfriaron a -78 °C. Después se añadió cloruro de oxalilo (1,14 ml, 13,41 mmol). Después de 10 minutos, se añadió intermedio 1 (2,00 g, 6,70 mmol) en diclorometano (20 ml) gota a gota y se agitaron durante 20 min. Se añadió trietilamina (7 ml) y se agitó durante 1 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua y se extrajo con diclorometano. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un líquido de color amarillo (1,20 g, 60 %) que se utilizó como tal en la siguiente etapa.

30

35

Intermedio 3: (+)/(-)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxipropil)-4H-cromen-4-ona: A una solución del intermedio 2 (0,600 g, 2,02 mmol) en DMF (7,65 ml) en purga de nitrógeno, se le añadió azeótropo de ácido fórmico:triethylamina 5:2 (1,80 ml) seguido de [(S,S)tethTsDpenRuCl] (3,0 mg). La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 1,5 horas en purga de nitrógeno continua. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,450 g, 74 %). Masa: 299,0 (M⁺). Exceso enantiomérico: 78 %, enriquecida en el isómero de elución tardía (tiempo de retención: 9,72 min.) como se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H.

40

Intermedio 4: (+)/(-)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxipropil)-4H-cromen-4-ona: El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color amarillo (0,500 g, 83 %) utilizando un procedimiento similar al descrito para el intermedio 3, utilizando el intermedio 2 (0,600 g, 2,02 mmol), DMF (7,65 ml), azeótropo de ácido fórmico:triethylamina 5:2 (1,80 ml) y [(R,R)tethTsDpenRuCl] (3,0 mg). Masa: 298,9 (M⁺). Exceso enantiomérico: 74,8 %, enriquecida en el isómero de elución rápida (tiempo de retención: 8,52 min.) Como se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H.

45

50

Intermedio 5: (R)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxipropil)-4H-cromen-4-ona:

Etapas 1: (R)-2-(1-(benciloxi)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona: A 2-(3-fluorofenil)-1-(2-hidroxifenil)etanona (2,15 g, 9,36 mmol), en diclorometano (20 ml), se le añadieron HATU (4,27 g, 11,23 mmol), ácido R-(+)-2-benciloxibutírico (2,00 g, 10,29 mmol) y se agitaron durante 10 min, después se añadió gota a gota trietilamina (14,0 ml, 101,1 mmol) y se agitó a TA durante 24 h. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se extrajo con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,65 g, 45 %). RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,24 (dd, J = 7,9, 1,5 Hz, 1H), 7,74 (dt, J = 7,1, 1,7 Hz, 1H), 7,58 (dd, J = 8,3, 0,4 Hz, 1H), 7,44-7,06 (m, 10H), 4,51 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,34 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 4,25 (dd, J = 7,8, 6,2 Hz, 1H), 2,17-1,90 (m, 2H), 0,95 (t, J = 7,5 Hz, 3H). Masa: 389,0 (M⁺).

55

60

Etapas 2: (R)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxipropil)-4H-cromen-4-ona: A (R)-2-(1-(benciloxi)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (1,50 g, 3,86 mmol) en diclorometano (15 ml) enfriada a 0 °C se le añadió cloruro de aluminio (1,00 g, 7,72 mmol) en porciones y se agitó a TA durante 6 h. La mezcla de reacción se inactivó con solución de HCl 2 N, se extrajo con diclorometano, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró

65

a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,552 g, 48 %). RMN-¹H (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,24 (dd, J = 8,0, 1,6 Hz, 1H), 7,72 (m, 1H), 7,52 (dd, J = 8,4, 0,5 Hz, 1H), 7,44 (m, 2H), 7,12-7,01(m,3H), 4,49 (t, J = 7,0 Hz, 1H), 1,94 (m, 2H), 0,93 (t, J = 7,5 Hz, 3H). Masa: (299,0(M⁺). Pureza: 96,93 %. [α]_D²⁵ -14,73 (c = 1, CHCl₃). Exceso enantiomérico: 85,92 %, enriquecida en el isómero de elución rápida (tiempo de retención: 8,57 min.) como se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AS-3R.

Compuesto A

(RS)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

A una solución del intermedio 1 (2,50 g, 8,41 mmol) en THF (25 ml), se le añadieron 9-tritil-9H-purin-6 ilcarbamato de terc-butilo (4,81 g, 10,09 mmol) y trifenilfosfina (3,31 g, 12,62 mmol) y se agitaron a TA durante 5 min. Se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (2,5 ml, 12,62 mmol) y se agitaron a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró y se sometió a cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar un intermedio de color amarillo. Al intermedio, se le añadieron diclorometano (65 ml) y ácido trifluoroacético (7,9 ml) y la mezcla resultante se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se basificó con solución acuosa de bicarbonato de sodio, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato de sodio. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con metanol:diclorometano para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color marrón pálido (1,05 g, 30 %). PF: 148-150 °C. Masa: 415,6 (M⁺).

Compuesto A1

(S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

Método A: A una solución del intermedio 3 (0,250 g, 0,838 mmol) en THF (5 ml), se le añadieron 9-tritil-9H-purin-6-ilcarbamato de terc-butilo (0,479 g, 1,00 mmol) y trifenilfosfina (0,329 g, 1,25 mmol) y la mezcla resultante se agitó a TA durante 5 min. Después se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,25 ml, 1,25 mmol) y se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró y se sometió a cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el intermedio de color amarillo. Al intermedio en diclorometano (6 ml), se le añadió ácido trifluoroacético (1,2 ml) y se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se basificó con solución acuosa de bicarbonato de sodio, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato de sodio. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con metanol:diclorometano para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (0,015 g, 4 %). PF:137-140 °C. RMN-¹H (δ ppm, DMSO-d₆, 400 MHz): 12,94 (s, 1H), 8,12-8,10 (m, 4H), 7,84-7,80 (m, 1H), 7,61 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,50-7,41 (m, 2H), 7,28-7,18 (m, 3H), 5,20-5,06 (m, 1H), 2,10-1,90 (m, 2H), 0,84 (t, J = 3,7 Hz, 3H). Exceso enantiomérico: 77,4 % como se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H, enriquecida en el isómero de elución rápida (tiempo de retención = 7,90 min.).

Método B: A una solución del intermedio 5 (2,60 g, 8,68 mmol) en THF (52 ml), se le añadieron 9-tritil-9H-purin-6-ilcarbamato de terc-butilo (4,96 g, 10,42 mmol) y trifenilfosfina (2,76 g, 13,03 mmol) y la mezcla resultante se agitó a TA durante 5 min. Después se añadió azodicarboxilato de diisopropilo (0,25 ml, 1,25 mmol) y se agitaron a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se concentró y se sometió a cromatografía en columna con acetato de etilo:éter de petróleo para proporcionar el intermedio de color amarillo. Al intermedio en diclorometano (55 ml), se le añadió ácido trifluoroacético (14,2 ml) y se agitó a TA durante 12 h. La mezcla de reacción se basificó con solución acuosa de bicarbonato de sodio, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato de sodio. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna con metanol:diclorometano para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo pálido (1,00 g, 27 %). PF: 168-170 °C. Masa: 416,5 (M⁺+1). Exceso enantiomérico: 86,5 % como se determinó por HPLC en una columna Chiralpak AD-H, enriquecida en el isómero de elución rápida (tiempo de retención = 7,90 min.).

Método C: El compuesto del título se separó por condiciones de CFS preparativa a partir del Compuesto A (1,090 g) en una columna CHIRALPAK AY-H (250 x 30 mm; 5 μm) utilizando metanol: CO₂ (35:65) como la fase móvil a un caudal de 80 g/min. Sólido blanquecino (0,378 g). ee 100 %. Tr: 2,37 min. Masa: 416,1 (M⁺+1). PF: 149-152 °C.

Compuesto A2

(R)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona

Método A: El compuesto del título se obtuvo en forma de un sólido de color blanquecino (0,015 g, 4 %) utilizando un procedimiento similar al descrito para el Compuesto A1 (Método A) utilizando 9-tritil-9H-purin-6-ilcarbamato de terc-butilo (0,479 g, 1,00 mmol), intermedio 4 (0,250 g, 0,838 mmol), trifenilfosfina (0,329 g, 1,25 mmol), THF (5 ml) y azodicarboxilato de diisopropilo (0,25 ml, 1,25 mmol), seguido de la escisión del intermedio con ácido trifluoroacético (1,2 ml) y diclorometano (6 ml). PF: 139-141 °C. Masa: 415,6 (M⁺). Exceso enantiomérico: 81,6 % como se determina por HPLC en una columna Chiralpak AD-H, enriquecida en el isómero de elución tardía (tiempo de retención = 10,81 min.).

Método B: El compuesto del título se separó por condiciones de CFS preparativa a partir del Compuesto A (1,090 g) en una columna CHIRALPAK AY-H (250 x 30 mm; 5 µm) utilizando metanol:CO₂ (35:65) como la fase móvil a un caudal de 80 g/min. Sólido blanquecino (0,434 g). ee 98 %. Tr: 3,71 min. Masa: 416,1 (M⁺+1). PF: 162-164 °C.

5 ENSAYOS BIOLÓGICOS

Las propiedades farmacológicas de los compuestos descritos en el presente documento se pueden confirmar por una serie de ensayos farmacológicos. Los ensayos farmacológicos que se han realizado con los compuestos de acuerdo con la invención y/o sus sales farmacéuticamente aceptables se ejemplifican a continuación

10 Ensayo 1: Determinación fluorescente de la actividad de la enzima PI3 cinasa

Las fosfoinosítido 3 cinasas (PI3K) pertenecen a una clase de cinasas lipídicas que juegan un papel crítico en la regulación de varios procesos celulares clave. Las PI3K son capaces de fosforilar la posición 3-hidroxi de fosfoinosítoles generando de este modo segundos mensajeros implicados en acontecimientos de señalización corriente abajo. El ensayo de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo (HTRF) permite la detección de 3,4,5-trifosfato (PIP3) formado como resultado de la fosforilación de 4,5-bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2) por isoformas de PI3K, tales como α, β, γ o δ.

La actividad de la isoforma α, β, γ o δ de PI3K se determinó utilizando un kit de ensayo de HTRF™ de PI3K humana (Millipore, Billerica, MA) con modificaciones. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Brevemente, se añadieron 0,5 µl de inhibidor 40X (en DMSO al 100 %) o DMSO al 100 % a cada pocillo de una placa de color blanco de 384 pocillos (Greiner Bio-One, Monroe, NC) que contiene 14,5 µl de mezcla de amortiguador de reacción 1X/PIP2 (MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, PIP2 1,38 µM) con o sin enzima, seguido de 5 µl/pocillo de ATP 400 µM y se incubaron durante unos 30 minutos adicionales. La reacción se terminó por adición de 5 µl/pocillo de solución de detención (Millipore, Billerica, MA). Después se añadieron 5 µl de mezcla de detección (Millipore, Billerica, MA) a cada pocillo y se incubaron durante 6-18 horas en la oscuridad. La relación de HTRF se midió en un lector de microplacas (BMG Labtech., Alemania) a una longitud de onda de excitación de 337 nm y longitudes de onda de emisión de 665 y 615 nm con un tiempo de integración de 400 mseg contando con un retraso de 50 mseg. Los resultados para los compuestos A1 y A2 se muestran en la Tabla 1 a continuación. Los datos comparativos para el Compuesto A1 y Ejemplo 47 del documento WO 11/055215 se proporcionan en la Tabla 2.

TABLA 1

Compuesto	CI ₅₀ (nM)			
	PI3Kδ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ
A1	23,85	> 10000	> 4000	24,05
A2	>10 µM	ND	ND	>10 µM

TABLA 2

Compuesto	PI3K δ	PI3K γ	
	CI ₅₀ en nM	% de Inhibición a 1 µM	CI ₅₀ en nM
Ejemplo 47 de WO 11/055215	105,9	25,54	ND
Compuesto A1	23,85	-	24,05

Ensayo 2: Ensayo de proliferación celular *in vitro* en estirpes celulares leucémicas

Los ensayos de inhibición del crecimiento se realizaron utilizando medios complementados con FBS al 10 %. Las células se sembraron a una concentración de 5000 – 20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron compuestos de ensayo a un intervalo de concentración de 0,01 a 10000 nM después de 24 h. El crecimiento se evaluó utilizando el ensayo de reducción de colorante de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 0 h (antes de la adición del compuesto de ensayo) y 72 h después de la adición del compuesto de ensayo. La absorbancia se leyó en un Fluostar Optima (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 450 nm. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism y el porcentaje de inhibición debido al compuesto de ensayo en comparación con el control se calculó en consecuencia.

El Compuesto A1 provocó una reducción de la viabilidad celular de linfoma T (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, Hut-78 y HUT-102) con valores de GI₅₀ que varían de 1-5 µM para el intervalo de dosis sometido a ensayo. Además, el compuesto no mostró alguna citotoxicidad aparente durante el período de incubación de 72 h hasta 10 µM.

Ensayo 3: Inhibición de la fosforilación de AKT en estirpes celulares leucémicas

Las células MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, Hut-78, HUT-102, Sez4 y HH se incubaron con concentraciones deseadas de compuesto durante 48 h. Las células se lisaron y se determinó pAKT por análisis por transferencia Western. Las

El Compuesto A1 provocó una reducción de la expresión de pAKT en las estirpes celulares de linfoma T (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, HUT-78 y HUT-102) con valores de CE₅₀ que varían de 0,5-2 μ M para el intervalo de dosis sometido a ensayo. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Ensayo 4: Inhibición de la señalización de PI3K δ y γ en basófilos de la sangre entera humana

La señalización de PI3K δ y γ en basófilos manifestada por una alteración de la expresión de CD63 inducida por anti-Fc ϵ R1 o fMLP es un marcador farmacodinámico útil determinado utilizando el kit Flow2CAST[®] (Buhlmann Laboratories, Suiza). Brevemente, implica las siguientes etapas:

- Mezclar la muestra de sangre anti-coagulada invirtiendo el tubo de venopunción varias veces;
- Preparar tubos de polipropileno o poliestireno de 3,5 ml limpios y libres de pirógenos adecuados para mediciones de Citometría de Flujo;
- Añadir 49 μ l de sangre entera del paciente a cada tubo;
- Añadir 1 μ l de DMSO al 10 % (fondo) o compuesto (DMSO al 10 %) a los tubos asignados y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos;
- Pipetear 50 μ l del tampón de estimulación (fondo) o Ab anti-Fc ϵ R1 o fMLP a cada tubo;
- Añadir 100 μ l de tampón de estimulación a cada tubo;
- Mezclar suavemente. Añadir 20 μ l de reactivo de tinción (mezcla 1:1 de FITC-CD63 y PE-CCR3) a cada tubo;
- Mezclar suavemente, cubrir los tubos e incubar durante 15 minutos a 37 °C en un baño de agua (utilizando una incubadora tomará aproximadamente 10 minutos más de tiempo de incubación debido a la transferencia de calor menos eficiente);
- Añadir 2 ml de reactivo de lisis precalentado (18-28 °C) a cada tubo, mezclar suavemente;
- Incubar durante 5-10 minutos a 18-28 °C;
- Centrifugar los tubos durante 5 minutos a 500 x g;
- Decantar el sobrenadante utilizando papel secante;
- Resuspender el sedimento celular con 300-800 μ l de tampón de lavado; y
- Agitar con formación de vórtice suavemente y obtener los datos en el citómetro de flujo en el mismo día.

El porcentaje de células positivas CD63 dentro de la población de basófilos seleccionada se determinó en diferentes grupos de tratamiento y se normalizó para el control de vehículo.

El Compuesto A1 presentó una CE₅₀ de < 40 nM para Fc ϵ R1 (PI3K δ) y una CI₅₀ de < 40 nM para fMLP (PI3K γ) (n = 10). Los resultados se muestran en la Figura 9.

Ensayo 4A: Actividad celular que demuestra la selectividad del Compuesto A1 hacia la isoforma PI3K delta y PI3K gamma**Ensayo 4A1: Proliferación de Células B Inducida por Anti-IgM (para selectividad de PI3K δ)**

El objetivo de este estudio era evaluar el potencial inhibidor del Compuesto A1 en la proliferación de células B humanas inducida por anti-IgM.

Colocación en placa y tratamiento

- Las células B aisladas se resuspendieron a $1,0 \times 10^6$ células por ml. se añadieron 100 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se mantuvieron por triplicado.
- Se añadieron 50 μ l de dilución del fármaco y se mezclaron bien. Se mantuvieron un blanco de DMSO y un blanco de inductor.
- La placa tratada se incubó durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 % y después se añadieron 50 μ l de inductor 4X y se mezclaron por pipeteado.
- La placa se incubó durante a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 72 h.
- El medio se aspiró y se añadieron 150 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazán.
- La absorbancia se leyó a A₅₆₀ y A₆₄₀ nm.

Los datos demuestran el potencial inhibidor del Compuesto A1 en la inducción mediada por PI3K δ de la proliferación de células B humanas. Véase, por ejemplo, Baeker et al. *Journal of Immunology*, 134:3532-3538, 1985.

Ensayo 4A2: Fosforilación de AktS473 inducida por LPA en Fibroblastos 3T3 (para Selectividad de PI3Kβ)

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del Compuesto A1 en la fosforilación de AktS473 inducida por LPA mediada por la cinasa PI3Kβ en fibroblastos 3T3.

- Las células 3T3 se trataron con concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 min. Se añadió 1 ml de LPA 2X de modo que la concentración final fue de 5 μM y se incubó durante 5 min.
- El medio se desechó y se lavó con 1 ml de PBS 1X enfriado con hielo.
- Se añadieron 250 μl de tampón de lisis celular y se incubaron en hielo durante 30 min.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante estuvo a -80 °C hasta su análisis.
- Las muestras se analizaron por análisis por transferencia Western utilizando pAKT (S473) como anticuerpo primario e IgG-HRP anti-conejo como un anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1,42q (NIH, EE.UU.) y se normalizó para la actina (control de carga). Los datos se representaron utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

Los resultados demuestran la selectividad del Compuesto A1 por encima de la isoforma beta de PI3K. Véase Albuquerque et al, *J. Biol. Chem.* 278, 39830-39838, 2003.

Ensayo 4A3: Fosforilación de AktS473 Inducida por C5a en Macrófagos RAW 264.7 (para selectividad de PI3Kγ)

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del Compuesto A1 sobre la fosforilación de AktS473 inducida por c5a mediada por cinasa PI3Kγ en macrófagos RAW 264.7.

- Las células RAW 264.7 se trataron con concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 min. Se añadió 1 ml de c5a 2X de manera que la concentración final fue de 50 ng/ml y se incubaron durante 15 min.
- El medio se desechó y se lavó con 1 ml de PBS 1X enfriado con hielo.
- Se añadieron 250 μl de tampón de lisis celular y se incubaron en hielo durante 30 min.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su análisis.
- Las muestras se analizaron por análisis por transferencia Western utilizando pAKT (S473) como anticuerpo primario e IgG-HRP anti-conejo como un anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1,42q (NIH, EE.UU.) y se normalizó para la actina (control de carga). Los datos se representaron utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

La inhibición de pAktS473, un marcador corriente abajo de la señalización de PI3Kδ sugiere un papel para el Compuesto A1 en las vías oncogénicas reguladas por Akt en células RAW 264.7 inducidas por c5a. Véase To et al. *A.m. J. Respir. Crit. Care Med.*, 182, 897-904, 2010.

Ensayo 4A4: Fosforilación de Akt Inducida por PDGF en Células 3T3 (para Selectividad de PI3Kα)

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del Compuesto A1 en la fosforilación de AktS473 mediada por la cinasa PI3Kα en PDGF inducida por fibroblastos 3T3.

- Las células 3T3 se trataron con concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 min. Se añadió 1 ml de PDGF 2X de modo que la concentración final fue de 20 ng/ml y se incubaron durante 10 min.
- El medio se desechó y se lavó con 1 ml de PBS 1X enfriado con hielo.
- Se añadieron 250 μl de tampón de lisis celular y se incubó en hielo durante 30 min.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se recogió y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.
- Las muestras se analizaron por análisis por transferencia Western utilizando pAKT (S473) como anticuerpo primario e IgG-HRP anti-conejo como un anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1,42q (NIH, EE.UU.) y se normalizó para la actina (control de carga). Los datos se representaron utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

No se observó inhibición a 10 μM del Compuesto A1, demostrando la selectividad del Compuesto A1 sobre la isoforma alfa de PI3K. Véase Albuquerque et al., *J. Biol. Chem.* 278, 39830-39838, 2003.

La Tabla a continuación resume los resultados de los Ensayos 4A1-4A4.

ACTIVIDAD CELULAR QUE DEMUESTRA LA SELECTIVIDAD DEL COMPUESTO A1 HACIA LA ISOFORMA PI3K DELTA Y PI3K GAMMA	
CI ₅₀ celular de PI3K alfa (pAKT inducida por PDGF en fibroblastos 3T3)	>10000 nM
CI ₅₀ celular de PI3K beta (pAKT inducida por LPA en fibroblastos 3T3)	2067 nM
CI ₅₀ celular de PI3K delta (proliferación de células B humanas inducida por anti-IgM)	38,1 nM

ACTIVIDAD CELULAR QUE DEMUESTRA LA SELECTIVIDAD DEL COMPUESTO A1 HACIA LA ISOFORMA PI3K DELTA Y PI3K GAMMA	
Cl ₅₀ celular de PI3K gamma (pAKT inducida por c5a en macrófagos RAW)	22,3 nM

Ensayo 5: Inhibición de la apoptosis en estirpes celulares leucémicas

La apoptosis en células leucémicas se determinó utilizando un kit de Caspasa 3 in-situ (Millipore, EE.UU.) como se resume a continuación:

- Sembrar células leucémicas - a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en una placa de 6 pocillos
- Añadir el compuesto de ensayo/DMSO a concentraciones deseadas
- Incubar la placa durante 24 horas a 37 °C en incubadora a CO₂ al 5 %
- 10 • Recoger las células en un tubo de centrifuga de 2 ml
- Añadir 1,6 µl de reactivo FLICA 5X recién preparado y mezclar las células ligeramente chasqueando los tubos
- Incubar los tubos durante 1 hora a 37 °C en CO₂ al 5 %
- Añadir 2 ml de tampón de lavado 1X a cada tubo y mezclar
- Centrifugar las células a $< 400 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente
- 15 • Retirar con cuidado y desechar el sobrenadante, y agitar con formación de vórtice suavemente el sedimento celular para interrumpir cualquier agrupación de célula a célula
- Resuspender el sedimento celular en 300 µl de tampón de lavado 1X
- Coloque 100 µl de cada suspensión celular en cada uno de dos pocillos de una placa de microtitulación de color negro. Evitar la creación de burbujas
- 20 • Leer la absorbancia de cada pocillo utilizando una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm
- El porcentaje de aumento en la actividad de la caspasa-3 se manifestó por un aumento en la fluorescencia en comparación con el blanco de control que se ha de calcular.
- 25 El Compuesto A1 provocó una inducción dependiente de la dosis en la actividad de la caspasa-3 en estirpes celulares de linfoma T (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, Hut-78 y Hut-102).

Ensayo 6: Detección de la inhibición de pAKT en células CTCL primarias humanas

- 30 Análisis de citometría de flujo de la inhibición de pAKT: Se aislaron linfocitos T malignos purificados de donantes y se cultivaron durante la noche en RPMI/BSA al 1 %. Las células se incubaron con el compuesto de ensayo durante 1,5 h con una mezcla de citocinas añadida durante los 30 minutos finales. La composición de la mezcla de citocinas fue de IL2 20 ng/ml + IL7 5 ng/ml + IL15 10 ng/ml + FBS al 10 %. La fosforilación de AKT se determinó por citometría de flujo.
- 35 El tratamiento con el Compuesto A1 provocó una fosforilación de AKT de reducción dependiente de la dosis con CE₅₀ que varía desde 40-300 nM (% de datos de inhibición).

Ensayo 6A: Detección de la actividad antineoplásica en células de LLC humanas

- 40 Las células primarias de LLC se enriquecieron utilizando células B Rosette-Sep de Stem Cell Technology, que generalmente proporcionan una pureza del > 97 % de células B/células de LLC. Las células se sembraron a $2,5 \times 10^5$ por pocillo en una placa de 96 pocillos ya sea con medio libre de suero (SFM) o SFM + suero bovino fetal al 10 % inactivado por calor (volumen de 100 microlitros) en presencia de concentraciones deseadas del compuesto de ensayo y se cultivaron durante 3 días a 37 °C en una incubadora de dióxido de carbono. La citotoxicidad se determinó utilizando el ensayo de MTS.
- 45

El Compuesto A1 induce la citotoxicidad en células de LLC con una CE₅₀ mediana de < 100 nM en medio libre de suero y < 700 nM en medio de FBS al 10 %.

50

Ensayo 6B: Detección de la actividad antineoplásica en células de linfoma B derivadas de pacientes

- Se expusieron células primarias de tumores linfoides al compuesto de ensayo [Compuesto A1] para evaluar la inducción de la muerte celular. Las células derivaron de linfoma de células B grandes difusas (LCBGD), linfoma de células de manto (LCM), linfoma esplénico de zona marginal (LZME), linfoma extranodal de zona marginal (LEZM), o leucemia linfocítica crónica (LLC, n.º = 1). Las células se trataron con concentraciones deseadas del compuesto y se evaluó la apoptosis (Anexina V/PI) por citometría de flujo después de un período de incubación de 48 h.
- 55

- Casi todas las células primarias derivadas de linfomas de células B experimentaron un aumento en la muerte celular cuando se expusieron al compuesto de ensayo (Compuesto A1) a una concentración de $4 \mu\text{M}$. El fenómeno pareció
- 60

más evidente entre las células primarias derivadas de linfomas de células pequeñas (LZM, LCM, y LLC).

Ensayo 6C: Inhibición de la fosforilación de AKT en estirpes celulares de linfoma B

- 5 Se incubaron células LY-1, LY-10, Daudi, JEKO, REC y MAVER con concentraciones deseadas de [Compuesto A1] durante 48 horas. Las células se lisaron y se determinó pAKT por análisis por transferencia Western. Las bandas se cuantificaron utilizando ImageJ y se normalizaron para la actina.

10 El Compuesto A1 presentó una CE_{50} de 20 - 200 nM a través de las estirpes celulares de linfoma B sometidas a ensayo.

Ensayo 6D: Ensayo de citocinas en linfocitos T primarios co-estimulados por CD3 y CD28 anti-humanos

- 15 El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial inhibitor del Compuesto A1 sobre las citocinas producidas por linfocitos T primarios co-estimulados por CD3/CD28 anti-humanos.

Colocación en placa y tratamiento

- 20 • Las placas se recubrieron con 50 μ l de CD3 anti-humano a una concentración de 100 ng/ml ya sea durante la noche a 4 °C o durante 2 h a 37 °C. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con PBS estéril para retirar el anticuerpo no unido.
- Los linfocitos T humanos aislados se resuspendieron a $0,625 \times 10^6$ células por ml en tubos de 1,5 ml y se añadió 1 μ l de dilución de fármaco (1000X). Se mantuvieron un blanco de DMSO y un blanco no inducido.
- 25 • Las células se incubaron con el compuesto a temperatura ambiente durante 30 min y después se añadieron a los pocillos recubiertos con CD3 anti-humano de una placa de 96 pocillos, 240 μ l cada una. El CD28 anti-humano se añadió de inmediato, 10 μ l (25X) por pocillo.
- La placa se incubó a 37 °C, CO_2 al 5 % durante 24 h.
- Las placas se centrifugaron a 4000 rpm a temperatura ambiente, el sobrenadante se recogió y se almacenó a -20 °C.
- 30 • Las citocinas se determinaron utilizando un kit de ELISA comercial con la absorbancia leída a 450 y 570 nm.

Se calcularon los valores de CI_{50} de ocho experimentos independientes. El Compuesto A1 inhibió las citocinas de linfocitos T inducidas por CD3-CD28 anti-humanas con una CI_{50} de 24, 9,54 y 20,6 nM para $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL2 respectivamente. Los resultados se muestran en la Figura 10.

35

Ensayo 7: Neutrofilia pulmonar Inducida por lipopolisacáridos en el modelo de rata Wistar hembra

- 40 Un reclutamiento exagerado y activación posterior de neutrófilos es probable que sean importantes para el desarrollo y curso de varias enfermedades inflamatorias en las vías respiratorias y pulmones, tales como asma grave, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, y síndrome de dificultad respiratoria aguda. Los mecanismos por los cuales los neutrófilos contribuyen a estas enfermedades pueden implicar la liberación de enzimas proteolíticas, tales como la elastasa de neutrófilos, y radicales de oxígeno libre. Cuando se liberan, estos compuestos pueden causar broncoconstricción, hiperreactividad bronquial, hipersecreción, daño epitelial, y reconstrucción de tejidos en las vías respiratorias.

45

- Después del período de cuarentena, los animales en ayunas se aleatorizaron y se dividieron en diversos grupos dependiendo de sus pesos corporales. El compuesto de ensayo [Compuesto A1] se preparó como una suspensión en un vehículo que consistía en metilcelulosa al 0,5 % en Tween 80 como agente de suspensión. El compuesto o vehículo se administró por sonda oral en un volumen de 10 ml/kg. Las ratas Wistar hembra se anestesiaron con cetamina y la solución de LPS se administró por vía intratraqueal una hora después de la administración del compuesto a una dosis de 1 mg/kg. 6 h después de la instilación de LPS, los animales se desangraron con anestesia, y después se les insertó una cánula en la tráquea y los pulmones se lavaron con alícuotas de 5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de la cánula traqueal (volumen total de 20 ml). El fluido de lavado broncoalveolar (LBA) se almacenó a 2-8 °C hasta que se sometió a ensayo para el recuento total de células y diferencial de leucocitos. El fluido bronquioalveolar se centrifugó (500 x g durante 10 min) y el sedimento celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución salina heparinizada. Los números totales de glóbulos blancos se determinaron en el fluido de LBA o la sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial de células se calculó manualmente. Se centrifugaron cien microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y las platinas se observaron microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. El número de cada tipo celular entre 300 glóbulos blancos en el frotis celular se determinó y se expresó como un porcentaje. Se calculó el número de eosinófilos en cada FLBA o sangre.

60

- 65 El Compuesto A1 mostró una reducción dependiente de la dosis de la infiltración de neutrófilos en los pulmones con una DE_{50} de 6,5 mg/kg sugiriendo un papel terapéutico en los trastornos inflamatorios. Los resultados se muestran

en la Figura 1.

Ensayo 8: Modelo de Inflamación de bolsa de aire de rata inducida por lipopolisacáridos

- 5 El reclutamiento de leucocitos y la formación de mediadores pro-inflamatorios, incluyendo diferentes citocinas, son la evidencia de una respuesta inflamatoria. El modelo de bolsa de aire se desarrolló originalmente como una membrana sinovial facsímil para el estudio de los procesos inflamatorios que se presentan en la artritis reumatoide (AR). El modelo permite la cuantificación diferencial de especies de leucocitos que se acumulan en la pared de la bolsa de aire (tejido), así como las que transmigran en la cavidad de la bolsa de aire (lavado), y permite la
- 10 caracterización de las quimiocinas y moléculas de adhesión responsables de la diapédesis inducida por una diversidad de estímulos inflamatorios.

Se aclimataron ratas Wistar hembras (175-200 g) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales se distribuyeron aleatoriamente a diversos grupos basándose en sus pesos corporales. Los animales se

15 anestesiaron con éter y las bolsas de aire subcutáneas se hicieron inyectando 20 ml de aire estéril bajo la piel en el área intra-escapular (día 0) y se mantuvieron con una segunda inyección de 10 ml de aire filtrado estéril en el día 4. En el día 6, el tratamiento oral se inició 1 h antes de la inducción de la inflamación por inyección subcutánea de solución de LPS en el día 6. Un volumen de 5 ml de la solución de LPS disuelto en solución salina estéril (100 µg/kg) se inyectó en cada bolsa. Las muestras de fluido de bolsa se tomaron a 6 h después de la administración de LPS

20 lavando la bolsa con 5 ml de solución salina estéril y se retiraron 4 ml de líquido. Los números de leucocitos presentes en el fluido de la bolsa se determinaron microscópicamente utilizando un hemocitómetro. El contenido diferencial de células se determinó por examen microscópico de frotis de fluido teñidos con Diff-Quik.

El Compuesto A1 provocó una reducción dependiente de la dosis de la migración de neutrófilos en la bolsa de aire de rata con una DE₅₀ de 2,6 mg/kg sugiriendo un papel terapéutico en la artritis reumatoide. Los resultados se

25 muestran en la Figura 2.

Ensayo 9: Producción de TNF-α inducido por lipopolisacáridos

- 30 Las ratas Wistar hembras en ayunas se aleatorizaron en diferentes grupos dependiendo de sus pesos corporales. El compuesto de ensayo (Compuesto A1) se preparó como una suspensión en un vehículo que consistía en metilcelulosa al 0,5 %. El compuesto o vehículo se administró por sonda oral en un volumen de 10 ml/kg. La solución de LPS se administró por vía intraperitoneal una hora después de la administración del compuesto a una dosis de 0,3 mg/kg. La sangre se recogió en tubos separadores de suero a través de punción cardíaca noventa minutos
- 35 después de la inyección de LPS. El suero se separó y se almacenó a -20 °C y se analizó para determinar el TNFα mediante ELISA.

El Compuesto A1 redujo las concentraciones de TNFα en plasma sugiriendo un papel terapéutico en los trastornos inflamatorios (el porcentaje de inhibición observado a 1, 3 y 10 mg/kg fue del 5 %, el 15 % y el 40 %, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 3.

40

Ensayo 10A: Eosinofilia pulmonar inducida por ovoalbúmina en cobayas machos

- 45 La inflamación e hiperreactividad de las vías respiratorias (HRVR) son los rasgos y características distintivas del asma bronquial. La provocación de ratones pre-sensibilizados con el mismo alérgeno induce la inflamación de las vías respiratorias con infiltración eosinofílica preferencial y, como consecuencia, HRVR. La eosinofilia pulmonar y remodelación de las vías respiratorias en conjunto con el control neural alterado del tono de las vías respiratorias y la descamación epitelial de las vías respiratorias pueden contribuir a la HRVR en el asma.

50 Después del período de cuarentena, se recogieron 0,3 ml de muestras de sangre de la vena orbital por el método de plexo retro-orbital de cada animal individual y se analizaron en un analizador de células (ADVIA 2120, Siemens). Basándose en su recuento total celular, las cobayas se aleatorizaron y se dividieron en varios grupos. El pabellón auricular del oído se marcó con un marcador indeleble para su identificación. En el día 0, se registraron los pesos y los animales se sensibilizaron con 50 µg de ovoalbúmina (OVA) y 10 mg de solución de alumbre (1 ml) por vía

55 intraperitoneal. En el día 7 y día 14, el protocolo de sensibilización anterior se repitió. Los animales se observaron para detectar cualquier signo de enfermedad o reacción a la sensibilización hasta el día 19 y se registraron si los hubo. En el día 19, 20, y 21, después del tratamiento con el compuesto de ensayo por sonda oral, 30 minutos más tarde los animales se expusieron a prueba de provocación con ovoalbúmina al 0,5 % p/v, al 0,5 % y al 1 % respectivamente. Los animales del grupo de control y simulado se trataron con metilcelulosa al 0,5 % p/v (vehículo).

60 Los grupos de control simulados se sensibilizaron con 10 mg de alumbre en los días 0, 7 y 14 y se expusieron a solución salina (SAL) con la misma velocidad de nebulización en el día 19, 20 y 21. Veinte horas después de la última prueba de provocación con OVA, la hiperreactividad de las vías aéreas se midió por pletismografía de cuerpo completo contra dosis acumulativas de prueba de provocación con metacolina (75, 100, 125 y 150 µg/ml), después de medir la respuesta de las vías respiratorias, se recogieron muestras de sangre y fluido de LBA. Las muestras se

65 analizaron para el recuento total celular utilizando cámara de Neubauer bajo el microscopio y el recuento diferencial de leucocitos se realizó manualmente.

Como se representa en las Figuras 4A y 4B, el Compuesto A1 provocó una reducción dependiente de la dosis significativa de la hiperreactividad de las vías respiratorias frente a una prueba de provocación con metacolina de cobayas sensibilizadas.

- 5 Como se representa en las Figuras 4C-4E, el Compuesto A1 provocó una reducción dependiente de la dosis significativa en la infiltración de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar de cobayas sensibilizadas.

Ensayo 10B: Modelo de asma murino

- 10 La inflamación de las vías respiratorias e hiperreactividad (HRVR) son los rasgos y características distintivas del asma bronquial. La provocación de ratones pre-sensibilizados con el mismo alérgeno induce la inflamación de las vías respiratorias con infiltración eosinofílica preferencial y, como consecuencia, HRVR. La eosinofilia pulmonar y la reconstrucción de las vías respiratorias en conjunto con el control neural alterado del tono de las vías respiratorias y la descamación epitelial de las vías respiratorias pueden contribuir a la HRVR en el asma. Después del período de
- 15 cuarentena, basándose en sus pesos corporales, los ratones se aleatorizaron y se dividieron en cuatro grupos (n = 7). Las colas se marcaron con un marcador indeleble para su identificación. En el día 0, se registraron los pesos y los animales se sensibilizaron con 100 µg de ovoalbúmina y 10 mg de solución de alumbre (0,2 ml) por vía intraperitoneal. En el día 7 y día 14, el protocolo de sensibilización anterior se repitió. Los animales se observaron para detectar cualquier signo de enfermedad o reacción a la sensibilización hasta el día 24 y se registraron si los
- 20 hubo. En el día 24, 25, y 26, después del tratamiento con compuesto de ensayo por sonda oral, 30 minutos más tarde los animales se expusieron a prueba de provocación con ovoalbúmina al 10 % p/v. Los animales del grupo de control y simulado se trataron con metilcelulosa al 0,5 % p/v (vehículo). Los grupos de control simulado se sensibilizaron con 10 mg de alumbre en el día 0, 7 y 14 y se expusieron a una solución salina con la misma velocidad de nebulización en el día 24, 25 y 26. Cuarenta y ocho horas después de la última prueba de provocación
- 25 con OVA, la hiperreactividad de las vías respiratorias se midió por pletismografía de cuerpo completo frente a dosis acumulativas de prueba de provocación con metacolina (2,5, 10, 50 y 100 mg/ml), después de medir la respuesta de las vías respiratorias, se recogieron muestras de sangre y fluido de LBA. Las muestras se analizaron para el recuento total celular utilizando cámara de Neubauer bajo el microscopio y el recuento diferencial de leucocitos se hizo manualmente. Como se representa en las Figuras 5A y 5B, el Compuesto A1 a una dosis de 3 mg/kg provocó
- 30 una reducción significativa en la hiperreactividad de las vías aéreas contra el ensayo de provocación con metacolina de ratones sensibilizados con ovoalbúmina.

- Como se representa en las Figuras 5C-5E, el Compuesto A1 a una dosis de 3 mg/kg produjo una inhibición significativa de la infiltración de eosinófilos en el fluido de lavado broncoalveolar de los ratones sensibilizados con ovoalbúmina.
- 35

Ensayo 11: Artritis Inducida por colágeno en ratas Lewis

- Se aclimataron ratas Wistar hembras durante siete días antes del inicio del experimento y se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en sus pesos corporales. En el día 0, los animales se trataron por
- 40 inyección intradérmica de 500 µg de colágeno bovino de tipo II emulsionado con adyuvante completo de Freund (IFA) que contenía MTB (4 mg/ml) administrado en la base de la cola. En el día 7 después de la inmunización primaria, los animales se trataron por inyección de refuerzo de 300 µg de CII en adyuvante incompleto de Freund por inyección intradérmica en la base de la cola. El inicio de la artritis en las articulaciones del tobillo por lo general se volvió visualmente aparente entre los días 12 y 14. Los animales se trataron con compuesto de ensayo o vehículo (administrado por vía oral) a partir del día después de la aparición de la artritis hasta el final del experimento (día 28) como un grupo terapéutico. Se tomaron puntuaciones de artritis por examen visual para detectar signos de inflamación de las articulaciones con regularidad a lo largo del período de estudio. Se tomaron pesos corporales y volúmenes de la pata, espesor de pata en los días 0, 3, 7, 10, 12, 14, 17, 21, 24 y 28. El día 28, al final del estudio, la
- 50 sangre se retiró en la necropsia y se procesó a suero o plasma y se tomaron todas las articulaciones, y tanto las patas delanteras como las patas traseras se fijaron en formol al 10 % para el análisis histopatológico después de tomar el trozo pequeño de tejido de cada articulación y se almacenaron a - 80 °C para el análisis de citocinas en homogeneizado de tejido. Criterios de puntuación clínica para las patas delanteras y traseras: 0 = normal; 1 = una articulación de la pata trasera o delantera afectada o eritema difuso mínimo e hinchazón; 2 = dos articulaciones de
- 55 las patas traseras o delanteras afectadas o eritema difuso leve e hinchazón; 3 = tres articulaciones de las patas traseras o delanteras afectadas o eritema difuso moderado e hinchazón; 4 = eritema difuso marcado e hinchazón, o = cuatro articulaciones de dedos afectadas; 5 = eritema difuso grave e hinchazón grave de la pata completa, incapaz de flexionar los dedos.
- 60 El Compuesto A1 dosificado terapéuticamente en el modelo de AIC en rata demuestra una eficacia significativa en la reducción de la hinchazón de la rodilla, así como de los tobillos.

- El análisis histológico de las articulaciones al final del estudio demuestra la conservación estructural completa a 15 mg/kg de Compuesto A1. Para comparación, un animal dosificado con vehículo muestra inflamación sinovial (S) y
- 65 evidencia significativa de resorción ósea, formación de pannus y degradación del cartílago y, como se representa en las Figuras 6A-6D, el Compuesto A1 muestra una reducción significativa de las puntuaciones histopatológicas

individuales y sumadas tanto para la rodilla como para el tobillo.

Ensayo 12: Infiltración celular aguda inducida por CSE en ratones Balb/c macho

5 Se aclimataron los animales (ratones Balb/c macho) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. En el día 1, los ratones se administraron con el compuesto de ensayo o vehículo por vía oral/intranasal y después de 1 h de la administración del compuesto de ensayo, los animales se anestesiaron con éter y se administró extracto de humo de cigarrillo por vía intranasal en volumen de 50 µl/ratón y se repitió la exposición a CSE a los animales todos los días
10 después de la administración del compuesto de ensayo durante cuatro días (d1 a d4). En el día 5, 24 horas después de la última exposición a CSE, los animales se desangraron con anestesia y se les insertó una cánula en la tráquea, y los pulmones se lavaron con alícuotas de 0,5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de una cánula traqueal (volumen total de 2 ml). El LBA se almacenó a 2-8 °C hasta que se sometió a ensayo para el recuento total celular y diferencial de leucocitos. El fluido bronquioalveolar se centrifugó (500 x g durante 10 min) y el
15 sedimento celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución salina heparinizada. El número total de glóbulos blancos se determinó en el fluido de LBA y sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial celular se calculó manualmente. Se centrifugaron cuarenta microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y se observó microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo
20 con sus características morfológicas. El número de cada tipo de célula entre 300 glóbulos blancos en el frotis de células se determinó y se expresó como un porcentaje, y se calculó el número de neutrófilos y macrófagos en cada FLBA.

Ensayo 13: Infiltración celular sub-crónica inducida por CSE en ratones Balb/c macho

25 Se aclimataron los animales (ratones Balb/c macho) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. En el día 1, los animales se anestesiaron con éter y se administró extracto de humo de cigarrillo por vía intranasal en volumen de 50 µl/ratón y se repitió la exposición a CSE a los animales diariamente durante ocho días (d1 a d8). En el día 9, los
30 ratones se administraron con el compuesto de ensayo o vehículo por vía oral/intranasal y después de 1 h de la administración del compuesto de ensayo, los animales se anestesiaron con éter y se administró extracto de humo de cigarrillo por vía intranasal en volumen de 50 µl/ratón y los animales se expusieron a CSE diariamente después de la administración del compuesto de ensayo durante los próximos tres días (d9 a d11), en el día 12, veinticuatro horas después de la última exposición a CSE los animales se desangraron con anestesia, y se les insertó una cánula en la
35 tráquea y los pulmones se lavaron con alícuotas de 0,5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de la cánula traqueal (volumen total de 2 ml). El LBA se almacenó a 2-8 °C hasta que se sometió a ensayo para el recuento total celular y diferencial de leucocitos. El fluido bronquioalveolar se centrifugó (500 x g durante 10 min) y el sedimento celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución salina heparinizada. Los números totales de glóbulos blancos se determinaron en el fluido de LBA y sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se
40 ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial celular se calculó manualmente. Se centrifugaron cuarenta microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y se observó microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. Se determinó el número de cada tipo de célula entre
45 300 glóbulos blancos en el frotis celular y se expresó como un porcentaje, y se calculó el número de neutrófilos y macrófagos en cada FLBA.

Ensayo 14: Inversión de la insensibilidad a corticosteroides en el modelo de inflamación pulmonar (EPOC) inducida por extracto de humo de cigarrillo

50 Se aclimataron ratones Balb/c hembra durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales después se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. En el día 1, los animales se anestesiaron con éter y se administró extracto de humo de cigarrillo por vía intranasal en volumen de 50 µl/ratón y los animales se expusieron a CSE a diario durante los siguientes cinco días (d1 a d6). En el día 7, a los ratones se les administró dexametasona a 10 mg/kg por sonda oral y 60 minutos más tarde, a los ratones se les administró
55 CSE por vía intranasal y se repitió durante los siguientes cuatro días (d7 a d11). Desde el día 9 hasta el día 11 a los ratones se les administró el compuesto de ensayo o vehículo por vía oral/intranasal y 30 minutos después de la administración de dexametasona y 30 minutos más tarde los animales se anestesiaron con éter y se les administró extracto de humo de cigarrillo por vía intranasal en volumen de 50 µl/ratón y los animales se expusieron a CSE a diario después de la administración del compuesto de ensayo durante los siguientes dos días (es decir, d9 a d11),
60 en el d12, veinticuatro horas después de la última exposición a CSE, los animales se desangraron con anestesia, y se les insertó una cánula en la tráquea y los pulmones se lavaron con alícuotas de 0,5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de la cánula traqueal (volumen total de 2 ml). El LBA se almacenó a 2-8 °C hasta que se sometió a ensayo para el recuento total celular y diferencial de leucocitos. El fluido bronquioalveolar se centrifugó (500 x g durante 10 min) y el sedimento celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución salina heparinizada. El número total de glóbulos blancos se determinó en el fluido de LBA y sangre utilizando un contador
65 de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial celular se calculó manualmente. Se

centrifugaron cuarenta microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y se observó microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. Se determinó el número de cada tipo de célula entre 300 glóbulos blancos en el frotis celular y se expresó como un porcentaje, y se calculó el número de neutrófilos y macrófagos en cada fluido de LBA.

Ensayo 15: Infiltración celular aguda inducida por humo de cigarrillo en ratones Balb/c macho

Se aclimataron los animales (ratones Balb/c macho) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales después se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. En el día 1, a los ratones se les administró el compuesto de ensayo o vehículo por vía oral/intranasal y después de 1 hora de la administración del compuesto de ensayo los animales se colocaron en la caja de exposición de cuerpo completo. En el día 1 y d2 los ratones se expusieron al humo de la corriente principal de 6 cigarrillos y de 8 cigarrillos en el día 3, y de 10 cigarrillos en el día 4. La exposición al humo de cada cigarrillo duró 10 minutos (los cigarrillos deben quemarse completamente en los dos primeros minutos y seguido de un flujo de aire con ventilador para animales y los siguientes 20 minutos de exposición con aire ambiente fresco. Después de cada segundo cigarrillo se realizó un descanso adicional de 20 minutos con exposición al aire ambiente fresco. Los animales de control se expusieron a la cámara de aire ambiental. Desde el día 1 al d4, a los animales se les administró el compuesto de ensayo ya sea por vía oral o intranasal. En el día 5, 24 horas después de la última exposición al humo de cigarrillo (HC), los animales se desangraron con anestesia, y se les insertó una cánula en la tráquea y los pulmones se lavaron con alícuotas de 0,5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de una cánula traqueal (volumen total de 2 ml). El fluido broncoalveolar (LBA) recogido se almacenó a 2-8 °C hasta que se sometió a ensayo para el recuento total celular y diferencial de leucocitos. El fluido de LBA se centrifugó (500 x g durante 10 min) y el sedimento celular resultante se resuspendió en 0,5 ml de solución salina heparinizada. El número total de glóbulos blancos se determinó en el fluido de LBA y sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial celular se calculó manualmente. Se centrifugaron cuarenta microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para diferenciación y se observó microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. El número de cada tipo de célula entre 300 glóbulos blancos en el frotis celular se determinó y se expresó como un porcentaje, y se calculó el número de neutrófilos y macrófagos en cada fluido de LBA.

Resultados: Como se representa en las Figuras 7A y 7B, el Compuesto A1 redujo la infiltración de macrófagos y neutrófilos en FLBA indicando de este modo un papel terapéutico en las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas

Ensayo 16: Acumulación nasal de eosinófilos y neutrófilos inducida por ovoalbúmina en Ratones

Se aclimataron animales (ratones) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales después se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. Los animales se inmunizaron con OVA (40 µg/kg por vía intraperitoneal) en el día 1 y 5. Para obtener respuestas inflamatorias locales en la nariz, los ratones se sometieron a pruebas de provocación repetidamente por vía intranasal (10 µl/por fosa nasal) en los días 12-19 con OVA (OVA al 3 % en solución salina). En el día 19, los ratones no en ayunas se dosificaron intranasalmente (10 µl/fosa nasa) ya sea con vehículo o compuesto de ensayo 2 horas antes del comienzo la prueba de provocación con OVA final. Dos horas más tarde, cada animal recibió una prueba de provocación con OVA intranasal final (3 %). Después de unas 8 horas adicionales, cada animal se anestesió y el lavado nasal se realizó mediante la instilación de 1 ml de PBS en las fosas nasales posteriores a través de una cánula traqueal implantada rostralmente que se extendía a una posición que era de aproximadamente 1 mm antes de las fosas nasales posteriores. Este procedimiento se repitió para proporcionar un rendimiento de aproximadamente 2 ml de fluido de lavado. El número total celular en las muestras de fluido de lavado nasal se midió utilizando un hemocitómetro. Los frotis de citospina de las muestras de fluido de lavado nasal se prepararon por centrifugación a 1200 rpm durante 2 min a TA y se tiñeron utilizando un sistema de tinción Diff-Quik (Dade Behring) para los recuentos diferenciales celulares. Las células se contaron utilizando microscopía de inmersión en aceite.

Ensayo 17: Acumulación celular inducida por Poli-I:C en ratones

Se aclimataron ratones A/J libres de patógenos específicos (machos, 5 semanas de edad) durante siete días antes del inicio del experimento. Los animales después se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos basándose en su peso corporal. A los animales se les administró poli (I:C)-LMW (poli-IC; 1 mg/ml, 40 µl) por vía intranasal dos veces al día durante 3 días con anestesia con isoflurano al 3 %. Los animales se trataron con compuesto de ensayo por vía intranasal (35 µl de solución en DMSO al 50 %/PBS) 2 horas antes de cada tratamiento con poli-I:C. Veinticuatro horas después de la última prueba de provocación con poli-I:C, los animales se anestesiaron, se les insertó una cánula en la tráquea y se recogió el FLBA. Las concentraciones de los macrófagos alveolares y neutrófilos en FLBA se determinaron utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento diferencial celular se calculó manualmente. Se centrifugaron cuarenta microlitros de la suspensión celular utilizando citospina 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre

para diferenciación y se observó microscópicamente para identificar los eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. El número de cada tipo de célula entre 300 glóbulos blancos en el frotis celular se determinó y se expresó como un porcentaje, y se calculó el número de neutrófilos y macrófagos en cada fluido de LBA.

Aunque la invención se ha descrito en el presente documento con referencia a realizaciones particulares, ha de entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Por tanto, ha de entenderse que se pueden hacer numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que se pueden idear otras disposiciones sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención como se ha descrito anteriormente. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas definan el alcance de la invención y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por la misma.

Composición farmacéutica del Compuesto A1

Ejemplo I

Se prepararon las cápsulas que se describen a continuación que contenían 5 o 10 mg de Compuesto A1.

Ingredientes	% p/p
Compuesto A1	4,5
Celulosa microcristalina (Avicel PH102)	83,8
Hidroxipropil celulosa (Klucel LF)	4,5
Agua Purificada	c.s.
Hidroxipropil celulosa poco sustituida (L-HPC; LH-11)	5,9
Talco	0,3
Dióxido de silicio coloidal (Aerosil-200)	0,3
Estearato de magnesio	0,6

Ejemplo II

Se prepararon las cápsulas que se describen a continuación que contenían 25, 50, o 100 mg de Compuesto A1.

Ingredientes	% p/p
Compuesto A1	22,7
Celulosa microcristalina (Avicel PH102)	67,2
Hidroxipropil celulosa (Klucel LF)	3,4
Agua Purificada	c.s.
Hidroxipropil celulosa poco sustituida (L-HPC; LH-11)	5,7
Talco	0,2
Dióxido de silicio coloidal (Aerosil-200)	0,2
Estearato de magnesio	0,6

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre 2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto se selecciona entre (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el compuesto es (S)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el compuesto está sustancialmente libre de (R)-2-(1-(9H-purin-6-ilamino)propil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
5. El compuesto de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el compuesto tiene un exceso enantiomérico mayor de aproximadamente el 95 %.
6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 cinasa δ presente en una célula poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de dicho compuesto.
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 cinasa y presente en una célula, poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de dicho compuesto.
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 cinasa δ y una PI3 cinasa γ presentes en una célula, poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de dicho compuesto.
10. El compuesto para su uso como en una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que la inhibición tiene lugar en un sujeto que padece una enfermedad, trastorno o afección seleccionada entre cáncer, una enfermedad ósea, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inmunitaria, una enfermedad del sistema nervioso, una enfermedad metabólica, una enfermedad respiratoria, trombosis y enfermedad cardíaca.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de la leucemia en un paciente que necesita el mismo, que comprende la administración de una cantidad eficaz de dicho compuesto.
12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento del asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un paciente que necesita el mismo, que comprende la administración de una cantidad eficaz de dicho compuesto.
13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para el uso en el tratamiento de la artritis reumatoide, la psoriasis, el lupus o la encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE) en un paciente que necesita el mismo, que comprende la administración de una cantidad eficaz de dicho compuesto.
14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC), el linfoma no Hodgkin (LNH), el linfoma de Hodgkin (LH), la leucemia mieloide aguda (LMA), el mieloma múltiple (MM), el linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP) o la enfermedad del linfoma no Hodgkin indolente (LNH-I) en un paciente que necesita el mismo, que comprende la administración de una cantidad eficaz de dicho compuesto.
15. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección que se beneficiaría de inhibir la actividad catalítica de una PI3 cinasa δ/γ .
16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada a PI3K que comprende la administración a un sujeto que necesita el mismo de una cantidad eficaz de dicho compuesto.
17. El compuesto para su uso como en la reivindicación 16, que comprende adicionalmente administrar un agente activo adicional seleccionado entre agentes antineoplásicos, agentes anti-inflamatorios, agentes inmunosupresores, esteroides, agentes anti-inflamatorios no esteroides, antihistamínicos, analgésicos y mezclas de los mismos.

18. El compuesto para su uso como en la reivindicación 16, en el que la enfermedad, trastorno o afección asociada a PI3K es una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, una enfermedad o trastorno que implica inflamación, cáncer u otra enfermedad proliferativa, una enfermedad o trastorno hepático, o una enfermedad o trastorno renal.

5

19. El compuesto para su uso como en la reivindicación 16, en el que la enfermedad, trastorno o afección asociada a PI3K se selecciona entre leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de células B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, linfoma de Burkett, leucemias mielógenas agudas y crónicas, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica, psoriasis, artritis reumatoide, osteoartritis, asma, EPOC, rinitis alérgica y lupus eritematoso.

10

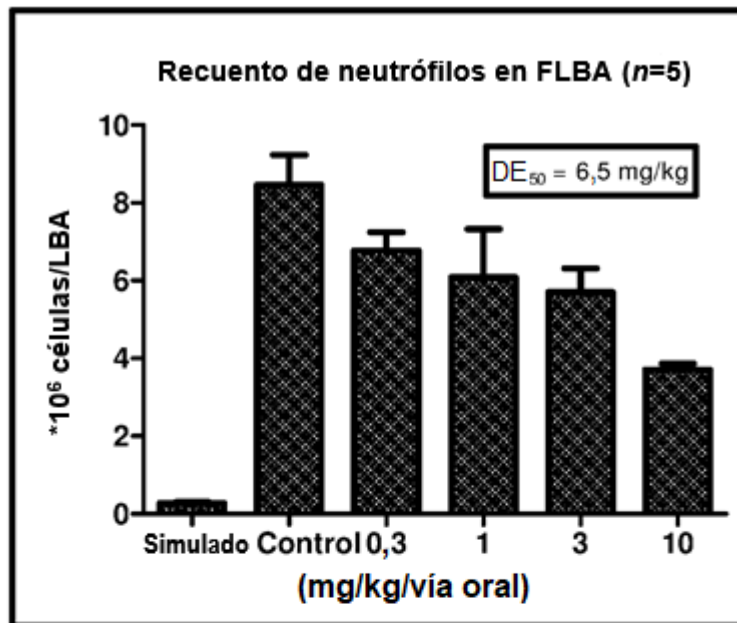


Figura 1

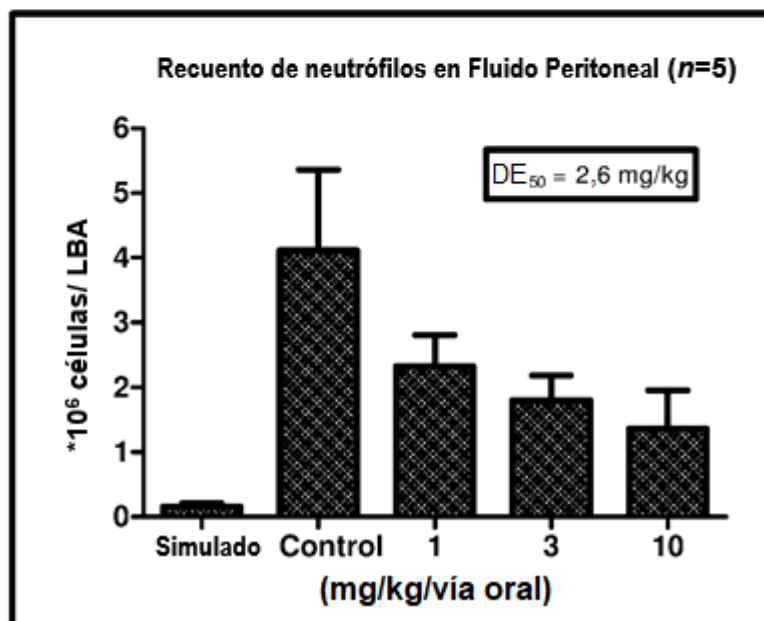


Figura 2

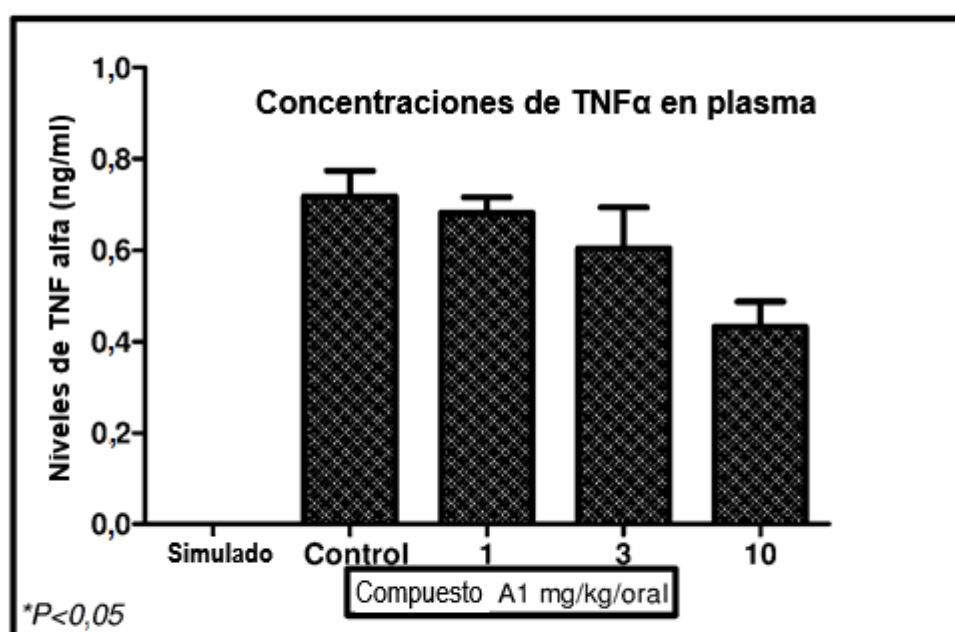


Figura 3

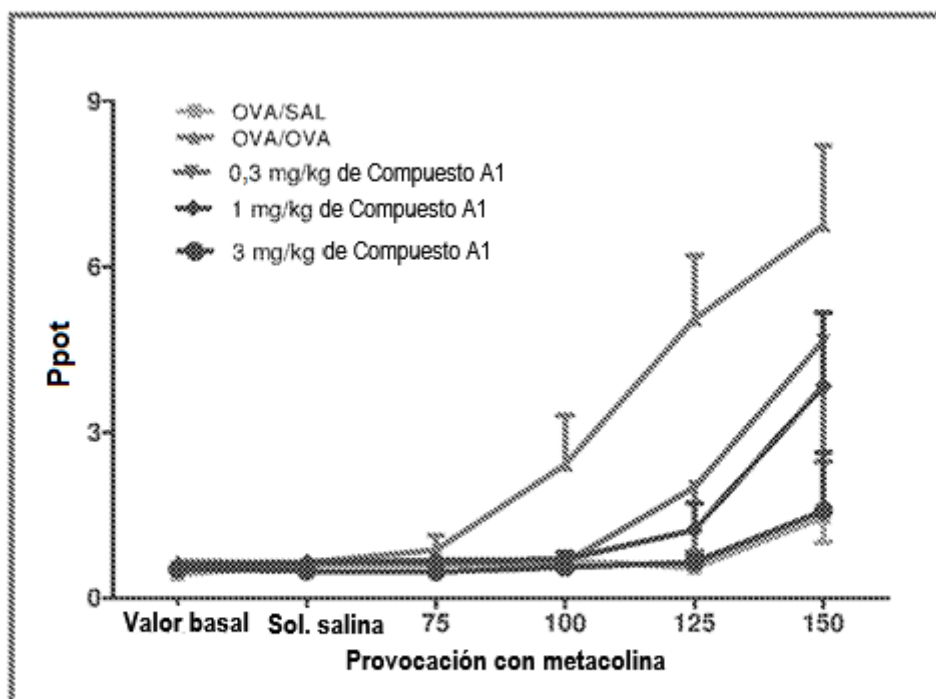


Figura 4A

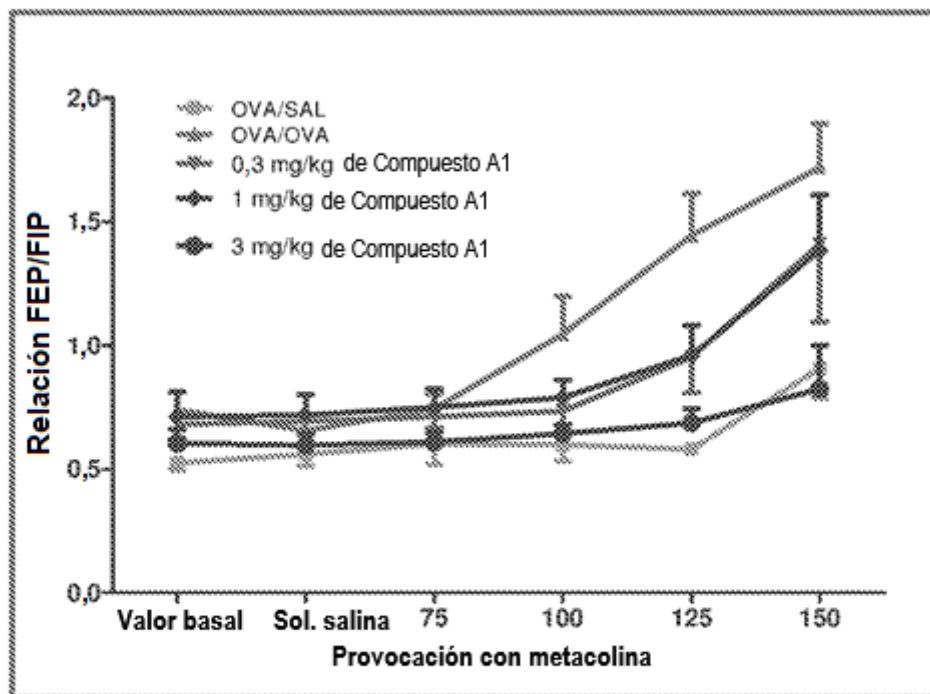


Figura 4B

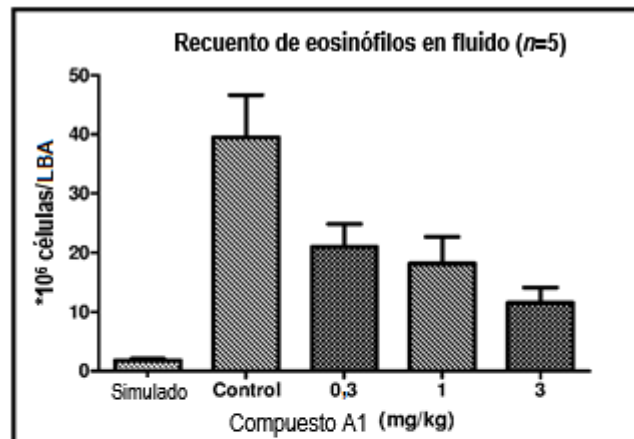


Figura 4C

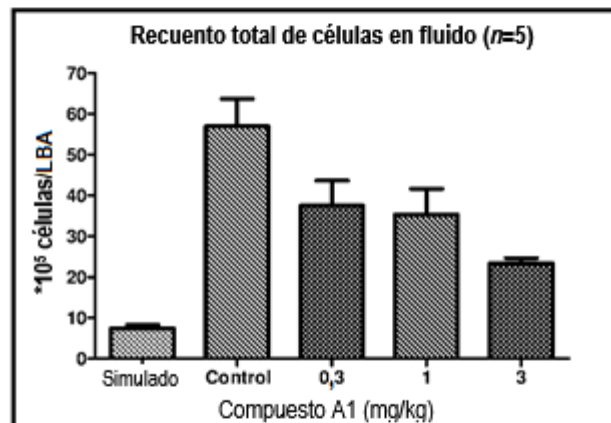


Figura 4D

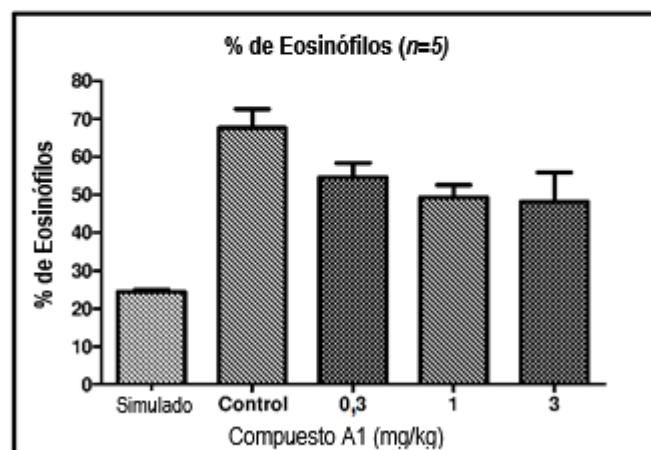


Figura 4E

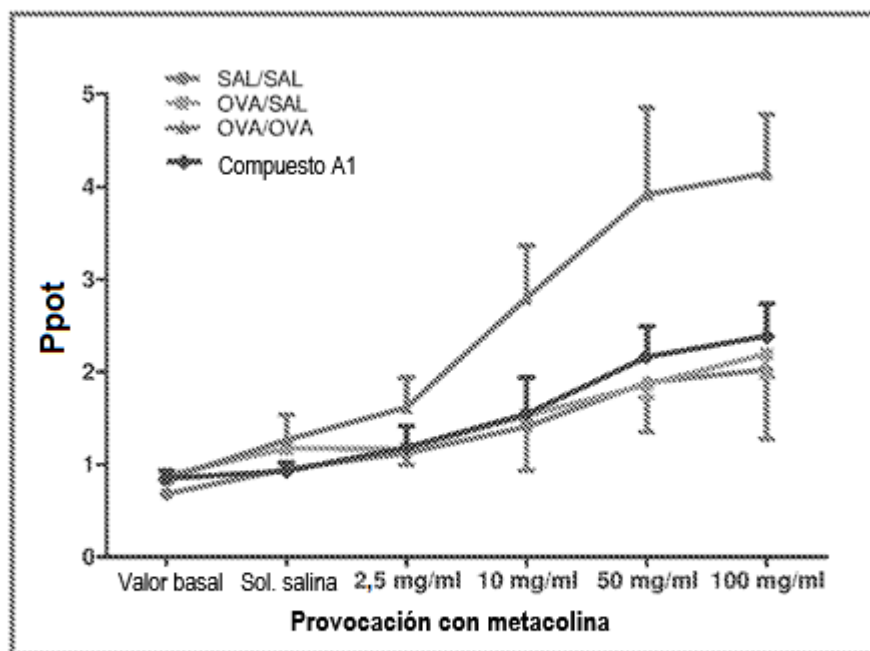


Figura 5A

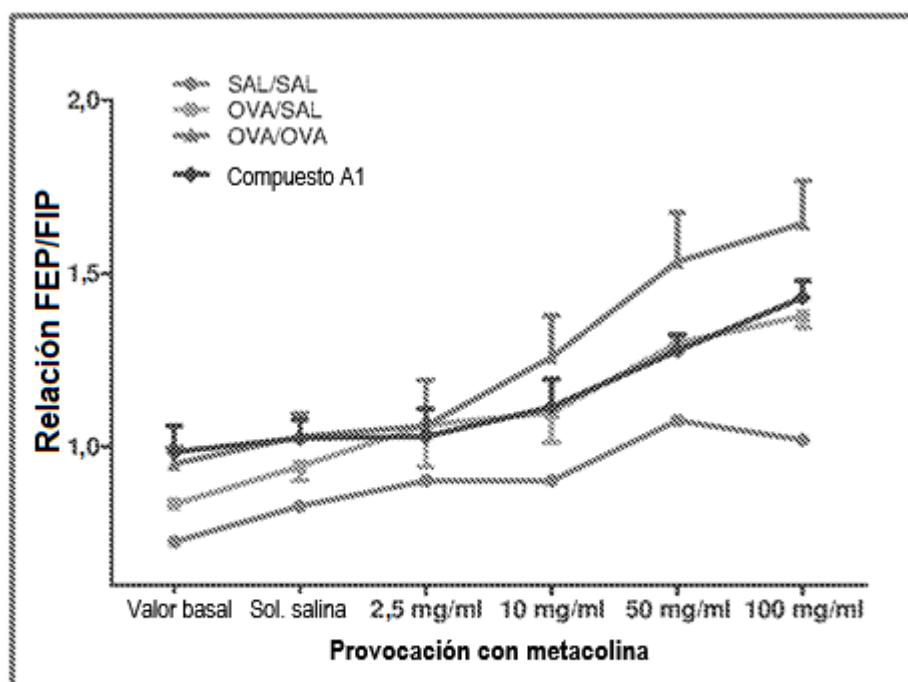


Figura 5B

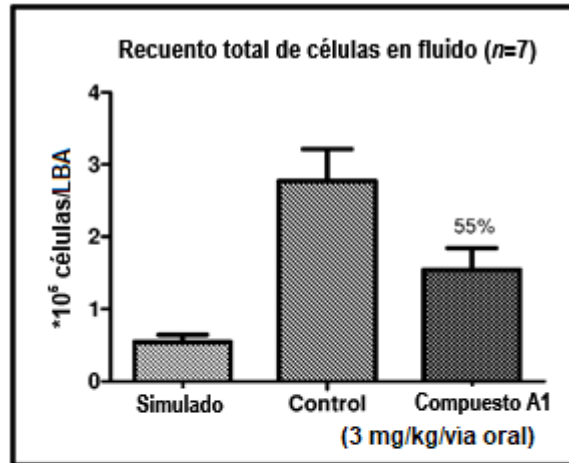


Figura 5C

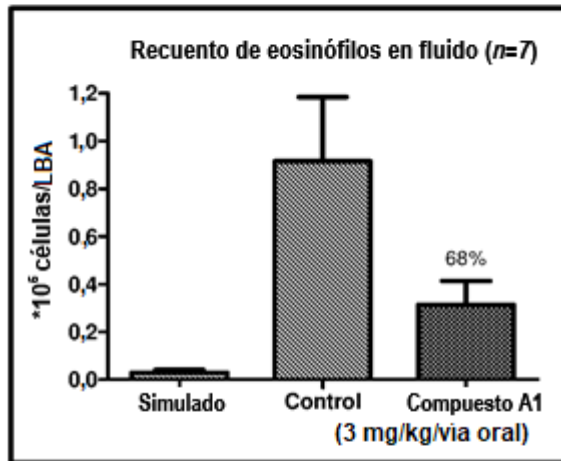


Figura 5D

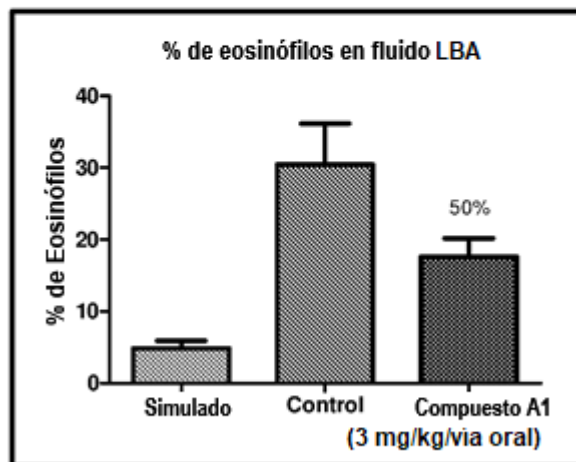


Figura 5E

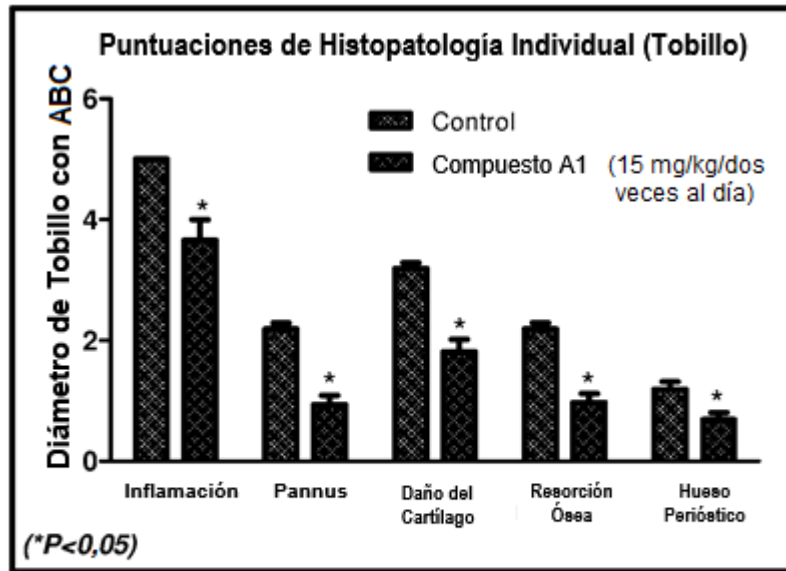


Figura 6A

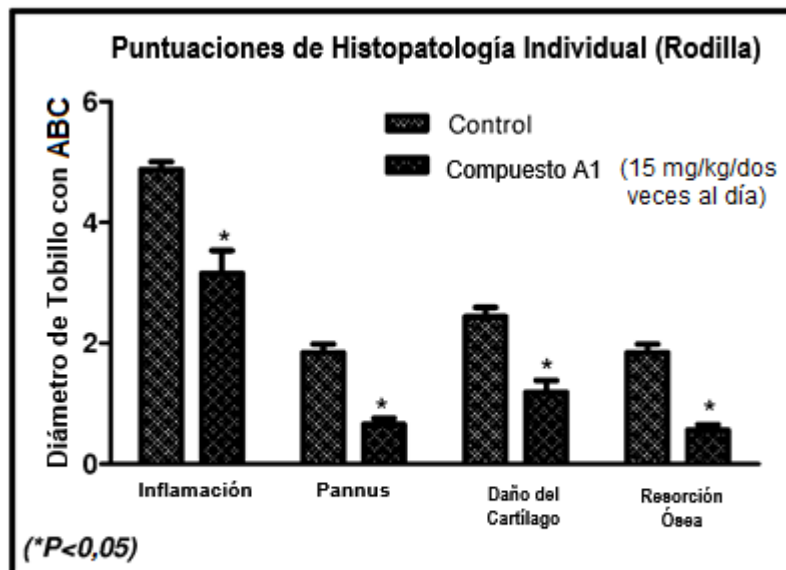


Figura 6B

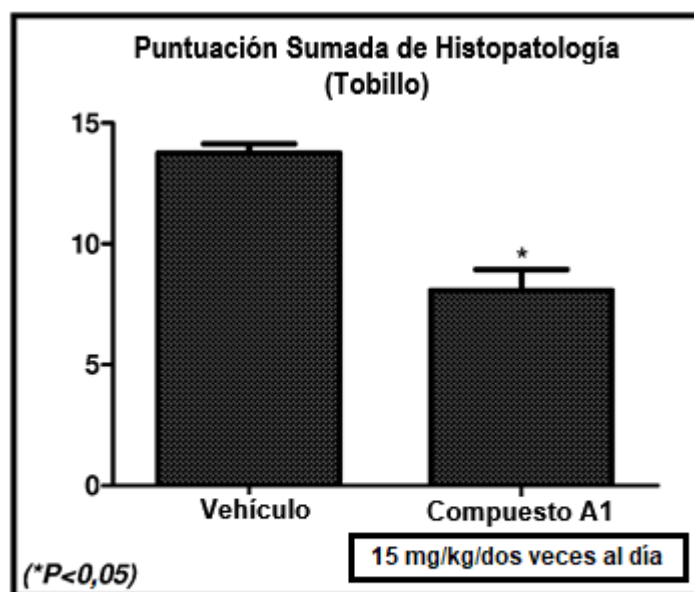


Figura 6C

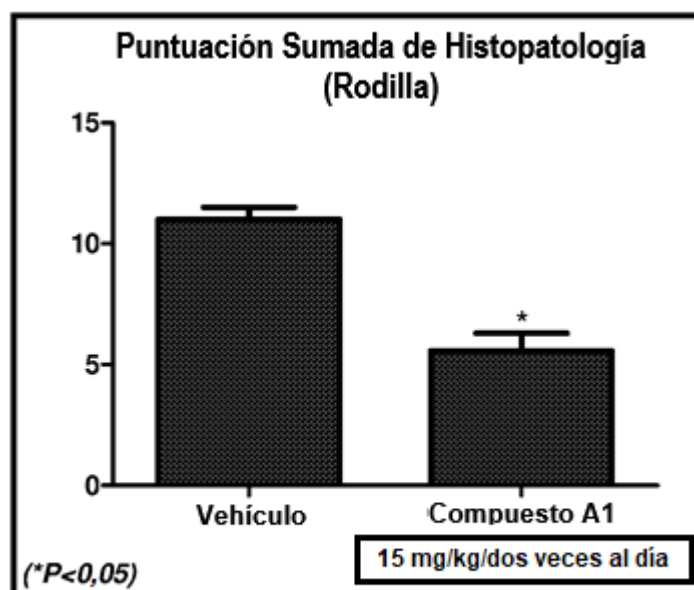


Figura 6D

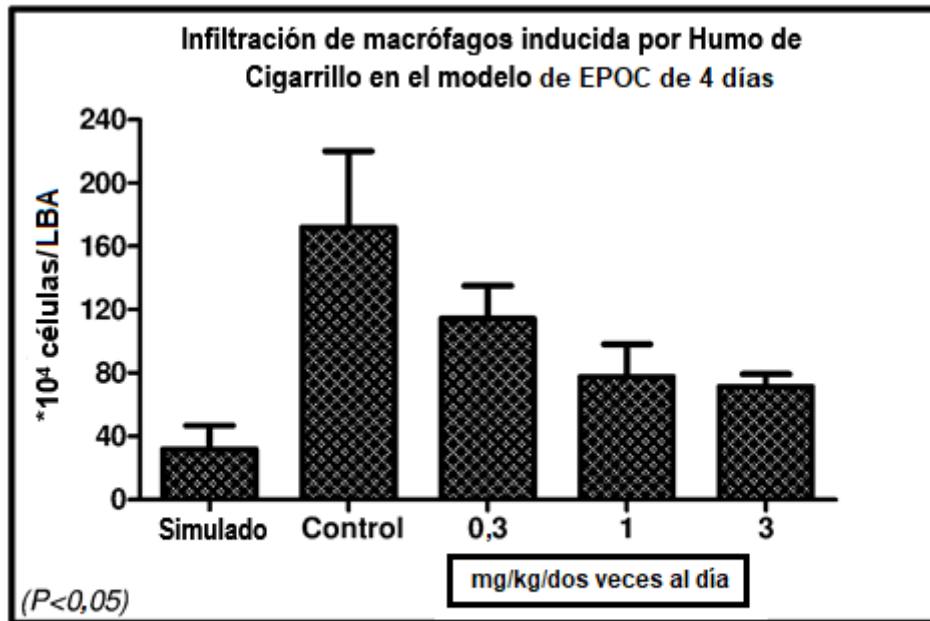


Figura 7A

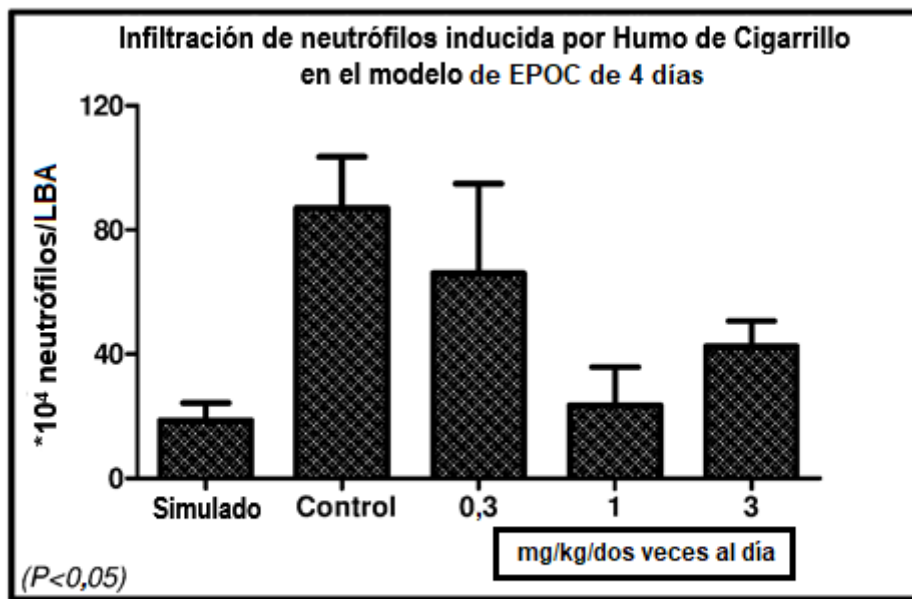


Figura 7B

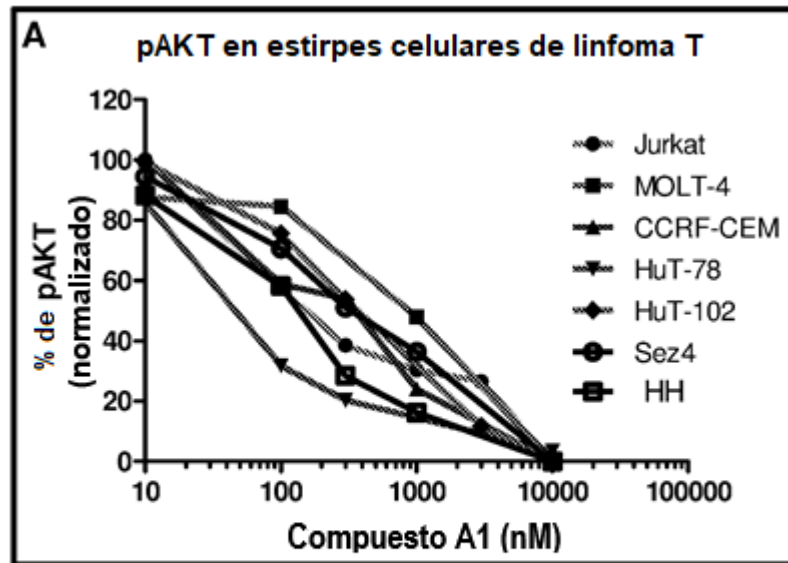


Figura 8

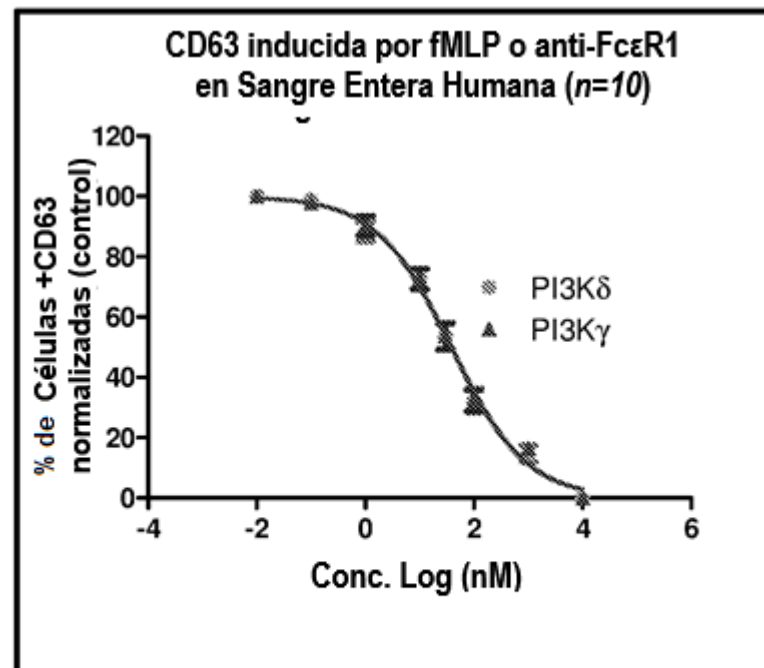


Figura 9

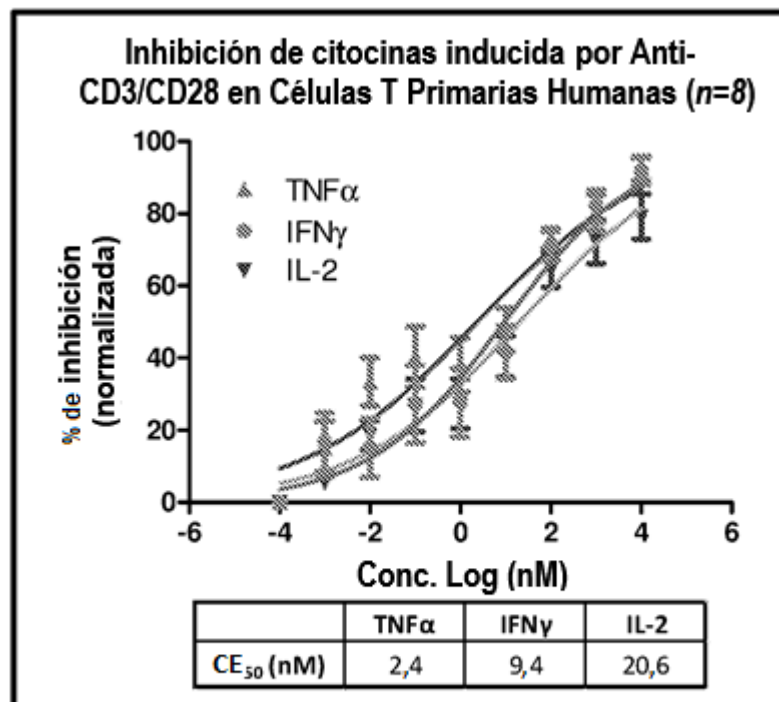


Figura 10