

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 748**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.06.2015 PCT/IB2015/054844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15198289**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.06.2015 E 15744357 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3160968**

54 Título: **Derivados de cromeno sustituidos como inhibidores duales selectivos de proteína cinasas PI3 delta y gamma**

30 Prioridad:

27.06.2014 IN 3144CH2014

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

11.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BHAVAR, PRASHANT KASHINATH y
VAKKALANKA, SWAROOP KUMAR VENKATA
SATYA**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 708 748 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados de cromeno sustituidos como inhibidores duales selectivos de proteína cinasas PI3 delta y gamma

5 CAMPO DE LA INVENCION

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

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La fosfoinositida-3 cinasa (PI3K) pertenece a una clase de lípido cinasas intracelulares que fosforilan el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo de inositol de lípidos fosfoinositídicos (PI) que generan los segundos mensajeros de lípidos. Mientras que las isoformas α y β de PI3K son ubicuas en su distribución, la expresión de las formas δ y γ de PI3K está restringida a las células hematógenas y las células endoteliales circulantes. A diferencia de PI3K α o PI3K β , los ratones que carecen de expresión de PI3K δ o PI3K γ no muestran ningún fenotipo adverso, lo que indica que el direccionamiento de estas isoformas específicas no dará como resultado una toxicidad manifiesta.

20 Recientemente, se han sugerido inhibidores dirigidos de la ruta de PI3K como agentes inmunomoduladores. Este interés se deriva del hecho de que la ruta de PI3K cumple múltiples funciones en la señalización de células inmunitarias, principalmente a través de la generación de fosfatidilinositol (3,4,5)-fosfato de fosfato (PIP3), un segundo mensajero unido a la membrana. PIP3 recluta proteínas hacia el lado citoplásmico de la bicapa lipídica, incluidas las proteína cinasas y las GTPasas, iniciando una red compleja de cascadas de señalización descendentes importantes en la regulación de la adhesión de las células inmunes, la migración y la comunicación entre las células.

Las cuatro isoformas de PI3K de clase I difieren significativamente en su distribución tisular. PI3K α y PI3K β son ubicuas y se activan aguas abajo de los receptores tirosina cinasas (RTK), mientras que PI3K δ y PI3K γ se limitan principalmente a células hematopoyéticas y endoteliales, y se activan aguas abajo de los RTK, y los receptores acoplados a proteína G (GPCR), respectivamente. Los estudios genéticos con ratones han revelado que PI3K α y PI3K β son esenciales para el desarrollo normal, mientras que la pérdida de PI3K δ y/o PI3K γ produce descendientes viables con déficit inmunitarios selectivos.

El patrón de expresión y las funciones de PI3K δ y PI3K γ han generado mucho interés en el desarrollo de inhibidores de PI3K δ/γ como agentes activos para el tratamiento de muchas enfermedades, incluyendo, por ejemplo, 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 usan métodos tanto farmacológicos como genéticos han demostrado que estas dos isoformas a menudo 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, PI3K δ es esencial para la desgranulación en respuesta a la reticulación de IgE de los receptores Fc (Ali et al., *J. Immunol.*, 180, 2538-2544, 2008), mientras que PI3K γ desempeña un papel importante en la amplificación de la respuesta (Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441-451, 2002). Se han observado efectos similares en otras funciones celulares, incluida la localización de linfocitos y el estallido respiratorio de neutrófilos, donde PI3K γ desempeña un papel crítico y PI3K δ amplifica cada proceso. Las funciones no redundantes pero relacionadas de PI3K δ y PI3K γ han dificultado determinar cuál de las dos isoformas (solas o en combinación) es la mejor dirigida en un trastorno inflamatorio particular.

Los estudios que utilizan ratones que carecen de PI3K δ y/o PI3K γ o variantes sin actividad cinasa explícita de PI3K δ y PI3K γ han sido herramientas valiosas para comprender sus funciones. Por ejemplo, ratones inactivados PI3K δ demostraron una disminución de la quimiotaxis de neutrófilos, una disminución de la producción de anticuerpos (tanto dependiente de linfocitos T como independiente) (Jou et al., *Mol. Cell.Biol.*, 22, 8580-8591, 2002), y un menor número de linfocitos B maduros (Clayton et al., *J. Exp. Med.*, 196, 753-763, 2002; Jou et al., *Mol. Cell.Biol.*, 22, 8580-8591, 2002), y una disminución en su proliferación en respuesta a anti-IgM (Jou et al., *Mol. Cell.Biol.*, 22, 8580-8591, 2002). Este fenotipo se replicó en la variante sin actividad PI3K δ cinasa y con inhibidores selectivos de PI3K δ junto con una disminución del número y la proliferación de mastocitos, y una respuesta alérgica atenuada. La inactivación de PI3K γ contenía un mayor número de neutrófilos, pero menos receptivos, un menor número de macrófagos con menos respuesta y las células dendríticas mostraron una disminución de la desgranulación de los mastocitos (Laffargue et al., *Immunity*, 16, 441-451, 2002), una mayor relación de linfocitos T CD4+ a CD8+, un aumento de la

apoptosis timocítica, una disminución de la inducción de CXCR3 en las linfocitos T activados y una 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 parte cuando la variante sin actividad PI3K γ cinasa (que imita mejor la inhibición de la cinasa en lugar de la pérdida de la proteína) mostró 5 fenotipos de células inmunes similares, pero lo más importante es que no tenía defectos cardíacos. Posteriormente se demostró que el efecto cardíaco se debía a los efectos de andamiaje en lugar de a la actividad catalítica de PI3K γ (Olusegun et al., *Chemistry & Biology*, 1, 123-134, 2010, incluyendo las referencias citadas en el mismo). La doble inactivación de PI3K δ /PI3K γ fue viable, pero presentaba defectos graves en el desarrollo de los linfocitos T y la supervivencia de los timocitos. La combinación inactivación de PI3K γ /sin actividad PI3K δ cinasa produjo un fenotipo 10 similar que sugiere que, al menos dentro del sistema inmune, el papel de PI3K δ es probablemente solo catalítico. La interpretación de los estudios con ratones inactivados y sin actividad cinasa puede ser desafiante porque estos modelos proporcionan solo una imagen de estado estable del sistema inmunológico, carecen de control temporal y de dosis, y no permiten una comprensión completa de cómo reaccionará una respuesta inmune dinámica a la inhibición reversible. Los inhibidores selectivos con perfiles variables (PI3K δ , PI3K γ y PI3K δ/γ) son necesarios para 15 los estudios de señalización de leucocitos con el fin de evaluar las contribuciones relativas de cada PI3K a la activación de células inmunes (Olusegun *et al.*, anteriormente, incluyendo las referencias citadas en el mismo).

La doble inhibición 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 autoinmunes. La evidencia científica de la participación 20 de PI3K δ y PI3K γ en diversos procesos celulares subyacentes al asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se deriva de estudios de inhibidores y enfoques de direccionamiento génico (William et.al *Chemistry & Biology*, 17, 123-134, 2010 y Thompson, et al. *Chemistry & Biology*, 17:101-102, 2010). Además, la resistencia a terapias convencionales, tal como corticosteroides en varios pacientes con EPOC, se ha atribuido a una regulación ascendente de la ruta PI3K δ/γ . Por lo tanto, la interrupción de la señalización de PI3K δ/γ proporciona una nueva 25 estrategia destinada a contrarrestar la respuesta inmuno-inflamatoria. Debido al papel fundamental desempeñado por PI3K δ y PI3K γ en la mediación de la funcionalidad de las células inflamatorias, tal como la migración y la activación de los leucocitos, y la degranulación de los mastocitos, el bloqueo de estas isoformas también puede ser una estrategia eficaz para el tratamiento de la artritis reumatoide. Dada la criticidad establecida de estas isoformas en la vigilancia inmune, se esperaría que los inhibidores dirigidos específicamente a las isoformas PI3K δ and PI3K γ 30 atenuaran la progresión de la respuesta inmune encontrada en la inflamación de las vías respiratorias y la artritis reumatoide (William et.al *Chemistry & Biology*, 17, 123-134, 2010 y Thompson, et al. *Chemistry & Biology*, 17:101-102, 2010)

Se han proporcionado revisiones y estudios con respecto a PI3K y las rutas de proteína cinasa relacionadas por Liu 35 et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, 627-644, 2009); Nathan 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*, published August 2009. Se han proporcionado revisiones y estudios similares sobre el papel de PI3K δ y PI3K 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 bibliográficas se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

40 Compuestos tales como IPI-145 y CAL130 se han notificado como inhibidores duales de PI3K δ/γ (documentos de patente WO2012/008302 y WO2012/121953 respectivamente). IPI-145 está bajo investigación clínica para el cáncer, asma y artritis reumatoide. Se ha informado que IPI-45 tiene una dosis máxima tolerada (MTD) de 75 mg BID (55th ASH® Annual Meeting. New Orleans-LA, Dec 7-10, 2013). No hay informes de que CAL-130 haya sido investigado 45 con fines clínicos.

Todavía sigue existiendo la necesidad no satisfecha de moduladores de PI δ/γ PI3K duales para el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con los eventos mediados por δ/γ PI3K cinasas.

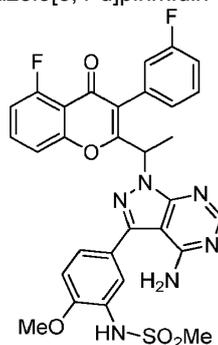
50 Se hace referencia adicional en el presente documento a las publicaciones internacionales de patente número WO 11/055215 y WO 12/151525 y las publicaciones de patente de Estados Unidos número 2011/0118257 y 2012/0289496.

RESUMEN DE LA INVENCION

55 La presente invención se dirige a inhibidores duales selectivos de PI3K delta (δ) y gamma (γ) proteína cinasas. Estos compuestos son adecuados para su uso en una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con PI3K, por ejemplo, una enfermedad proliferativa tal como el cáncer. La inhibición de tanto la proteína cinasa PI3K δ como PI3K γ puede proporcionar efectos beneficiosos en el tratamiento

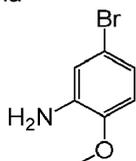
composición farmacéutica puede comprender además uno o más agentes activos adicionales (tales como agentes anticancerosos y los agentes activos analizados a continuación). En una forma de realización, la composición farmacéutica incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

- 5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il) etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida:

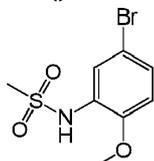


El proceso comprende las etapas de:

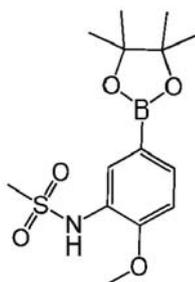
- 10 (a) hacer reaccionar 5-bromo-2-metoxianilina



con cloruro de metanosulfonilo para dar N-(5-bromo-2-metoxifenil)metanosulfonamida (Intermedio 1):

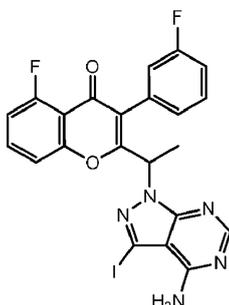


- 15 (b) hacer reaccionar el Intermedio 1 con bis(pinacolato)diboro, por ejemplo, en presencia de acetato potásico, para dar N-(2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanosulfonamida (Intermedio 2):



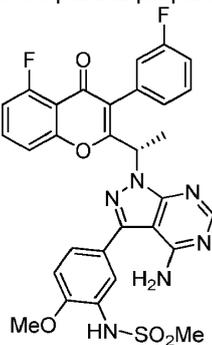
Intermedio 2;

- 20 y (c) hacer reaccionar 2-(1-(4-amino-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona



- 5 con el intermedio **2** en presencia de una base (tal como, por ejemplo, carbonato sódico) para dar el compuesto deseado N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il) etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida;
 (d) convertir opcionalmente N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida en una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

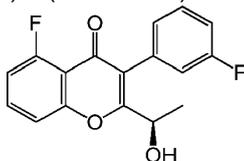
Aún otra forma de realización se refiere a un proceso para la preparación de un compuesto de fórmula (**A1**):



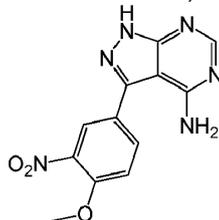
(A1).

- 10 El proceso comprende las etapas de:

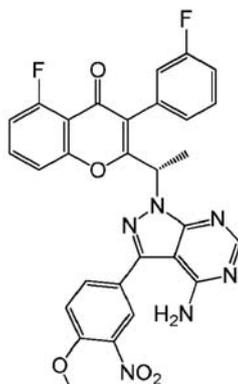
(a) someter (R)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxi-etil)-4H-cromen-4-ona:



- 15 a una reacción de Mitsunobu con 3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina:

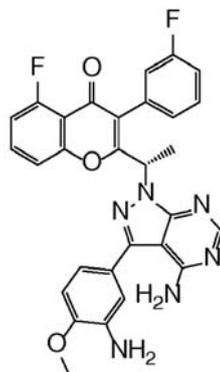


(por ejemplo, en presencia de trifetilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo) para dar (S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (Intermedio **3**):



Intermedio 3;

(b) reducir el Intermedio 3, por ejemplo, con un agente reductor, tal como Ni Raney, para dar (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (Intermedio 4):



Intermedio 4;

5

(c) tratar el Intermedio 4 con cloruro de metanosulfonilo para dar el compuesto deseado de la fórmula (A1);
y
(d) convertir opcionalmente el compuesto (A1) en una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Aún otra forma de realización son los intermedios útiles para preparar los compuestos de la presente invención, tales como (S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona, y sales de las mismas.

15 Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para inhibir PI3Kδ y PI3Kγ en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención.

Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para inhibir

20 PI3Kδ en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos uno de (R)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida (compuesto A2), una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, o un profármaco de la misma.

25 Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para tratar, prevenir y/o inhibir una enfermedad, trastorno o afección mediada por la proteína cinasa PI3K (tal como una enfermedad o trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer) en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención.

30 Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para inhibir

PI3K, en particular PI3K δ y PI3K γ , en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención.

5 Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria, autoinmune o proliferativa a través de la modulación de una proteína cinasa (tal como PI3K δ y PI3K γ) que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de al menos un compuesto de la presente invención. En una forma de realización, el compuesto de la presente invención inhibe tanto PI3K δ como PI3K γ .

10 Otra forma de realización más de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria, autoinmune o proliferativa mediante la modulación de una proteína cinasa (tal como PI3K δ y PI3K γ) mediante la administración a un paciente que necesita dicho tratamiento de una cantidad efectiva de al menos un compuesto de la presente invención, en combinación (simultánea o secuencialmente) con al menos otro agente antiinflamatorio, inmunomodulador o anticanceroso, o una combinación de los mismos. En una forma de
15 realización, el compuesto de la presente invención inhibe tanto PI3K δ como PI3K γ .

Los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de una diversidad de cánceres, incluyendo, pero sin limitación:

20 carcinoma, incluyendo, pero sin limitación, el de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, incluyendo cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello uterino, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas;
tumores hematopoyéticos de linaje linfocitoide, incluyendo, pero sin limitación, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin,
25 linfoma no Hodgkin, linfoma de células pilosas, y linfoma de Burkett;
tumores hematopoyéticos de linaje mielocitoide, incluyendo, pero sin limitación, leucemias mielógenas aguda y crónica, síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica;
tumores de origen mesenquimal, incluyendo, pero sin limitación, fibrosarcoma y rhabdomioma;
tumores del sistema nervioso central y periférico, incluyendo, pero sin limitación, astrocitoma,
30 neuroblastoma, glioma y schwannomas; y
otros tumores, incluyendo, pero sin limitación, melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratoacantoma, cáncer folicular tiroideo y sarcoma de Kaposi.

35 En una forma de realización, se administra una cantidad eficaz de un compuesto de la presente invención para tratar una leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos 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 o leucemia promielocítica.

40 Debido al papel clave de las proteína cinasas en la regulación de la proliferación celular en general, los compuestos de la presente invención pueden actuar como agentes citostáticos reversibles y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento de cualquier proceso de enfermedad que presente una proliferación celular anormal, tal como, por ejemplo, hiperplasia prostática benigna, poliposis adenomatosa familiar, neuro-fibromatosis, aterosclerosis, fibrosis pulmonar, artritis, psoriasis, glomerulonefritis, reestenosis después de angioplastia o cirugía vascular, formación de cicatriz hipertrófica, enfermedad inflamatoria del intestino, rechazo de trasplante, choque endotóxico e infecciones
45 fúngicas.

Los compuestos de la presente invención, como moduladores de la apoptosis, son útiles en el tratamiento del cáncer (incluyendo, pero sin limitación, los tipos mencionados anteriormente en el presente documento), infecciones virales (incluyendo, pero sin limitación, virus del herpes, poxvirus, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis y adenovirus),
50 enfermedades autoinmunes (incluyendo, pero sin limitación, lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis mediada por autoinmunidad, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, y diabetes mellitus autoinmune), trastornos neurodegenerativos (incluyendo, pero sin limitación, enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con el SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelosa), síndromes mielodisplásicos, anemia aplásica, lesión isquémica
55 asociados con infartos de miocardio, ictus y lesión por reperfusión, arritmia, aterosclerosis, enfermedades hepáticas inducidas por toxinas o relacionadas con alcohol, enfermedades hematológicas (incluyendo, pero sin limitación, anemia crónica y anemia aplásica), enfermedades degenerativas del sistema musculoesquelético (incluyendo, pero sin limitación, 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 supresión del desarrollo del SIDA en individuos infectados por el VIH.

Los compuestos de la presente invención pueden modular el nivel de síntesis de ARN y ADN celular. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento de infecciones víricas incluyendo, pero sin limitación, VIH, virus del papiloma humano, virus del herpes, virus de la viruela, virus de Epstein-Barr, virus Sindbis y adenovirus.

Los compuestos de la presente invención son útiles en la quimioprevención de cáncer. La quimioprevención se define en el presente documento como la inhibición del desarrollo de cáncer invasivo bloqueando el evento mutagénico iniciador o bloqueando la progresión de células pre-neoplásicas que ya han sufrido un insulto o que inhiben la recaída tumoral. Los compuestos de la presente invención también son útiles para inhibir la angiogénesis y la metástasis tumoral. Una forma de realización de la presente invención es un método para inhibir la angiogénesis o la metástasis tumoral en un paciente que lo necesita, mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

Otra forma de realización de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmune o trastorno inmune (por ejemplo, una enfermedad autoinmune), una enfermedad o trastorno que implica inflamación (por ejemplo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, glomerulonefritis, enfermedades neuroinflamatorias, esclerosis múltiple, uveítis y trastornos del sistema inmunitario), cáncer u otra enfermedad proliferativa, enfermedad o trastorno hepático, y enfermedad o trastorno renal. El método incluye administrar una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

Los ejemplos de trastornos inmunes incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, psoriasis, artritis reumatoide, vasculitis, enfermedad inflamatoria del intestino, dermatitis, osteoartritis, asma, enfermedad muscular inflamatoria, rinitis alérgica, vaginitis, cistitis intersticial, esclerodermia, osteoporosis, eccema, rechazo de injertos de trasplante alógeno o xenógeno (órgano, médula ósea, células madre y otras células y tejidos), enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso, enfermedad inflamatoria, diabetes tipo I, fibrosis pulmonar, dermatomiositis, síndrome de Sjogren, tiroiditis (por ejemplo, Hashimoto y autoinmune tiroiditis), miastenia gravis, anemia hemolítica autoinmune, esclerosis múltiple, fibrosis quística, hepatitis recurrente crónica, cirrosis biliar primaria, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica.

En una forma de realización, los compuestos descritos en el presente documento son útiles como inmunosupresores para evitar rechazos de injertos de trasplantes, rechazo de trasplantes alogénicos o xenogénicos (órgano, médula ósea, células madre, otras células y tejidos), y enfermedad de injerto contra huésped. En una forma de realización particular, los rechazos de injerto de trasplante son resultado de trasplantes de tejidos u órganos. En formas de realización adicionales, la enfermedad de injerto contra huésped es resultado de un trasplante de médula ósea o de células madre. Una forma de realización de la presente invención es un método para prevenir o disminuir el riesgo de rechazo de injerto de trasplante, rechazo de trasplante alogénico o xenogénico (órgano, médula ósea, células madre, otras células y tejidos), o enfermedad de injerto contra huésped que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más compuestos de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención también son útiles en combinación (administrados conjunta o secuencialmente) con tratamientos anticancerosos conocidos tales como, por ejemplo, terapia de radiación o con agentes citostáticos o citotóxicos o anticancerosos, tales como, por ejemplo, agentes interactivos de ADN, tal como cisplatino o doxorubicina; inhibidores de topoisomerasa II, tales como etopósido; inhibidores de topoisomerasa I tales como CPT-11 o topotecán; agentes que interaccionan con tubulina, tales como paclitaxel, docetaxel o las epotilonas (por ejemplo, ixabepilona), ya sean naturales o sintéticas; agentes hormonales, tales como tamoxifeno; inhibidores de timidilato sintasa, tales como 5-fluorouracilo; y antimetabolitos, tales como metotrexato, otros inhibidores de 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 de factores de crecimiento tales como erbitux (EGF) y herceptina (Her2); inhibidor de BTK, tal como ibrutinib; y otros moduladores de proteína cinasa, y cualquier combinación de los mismos.

Los compuestos de la presente invención son también útiles en combinación (administrados juntos o secuencialmente) con uno o más fármacos antiinflamatorios esteroideos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y derivados antiinflamatorios inmunoselectivos (ImAINE), y cualquier combinación de los mismos.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender además uno o más de los principios activos identificados anteriormente, tales como otros agentes anticancerosos.

5

Aún otra forma de realización es un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de leucemia en un paciente que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. En una forma de realización, la leucemia se selecciona de leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin (HL), leucemia mieloide aguda (AML), mieloma múltiple (MM), linfoma linfocítico pequeño (SLL), y linfoma no Hodgkin indolente (I-NHL).

10

Aún otra forma de realización de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno autoinmune en un paciente que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención. En una forma de realización, el trastorno autoinmune se selecciona de asma, EPOC, artritis reumatoide, psoriasis, lupus y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE).

15

Aún otra forma de realización de la presente invención es un compuesto para su uso en un método para tratar la rinitis alérgica en un paciente que lo necesite, que comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención.

20

En cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, el compuesto o los compuestos de la presente invención y los agentes activos adicionales opcionales se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

La Figura 1 muestra un gráfico de barras del recuento de neutrófilos en el fluido de lavado broncoalveolar (BALF) de ratas Wistar hembra tratadas con 10 mg/kg del Compuesto A1 (po) de acuerdo con el modelo de neutrofilia pulmonar inducida por lipopolisacáridos descrito en el Ensayo 7.

La Figura 2 muestra un gráfico de barras del recuento de neutrófilos en el fluido de lavado peritoneal de ratas Wistar tratadas con 1, 3 y 10 mg/kg del Compuesto A1 (po) de acuerdo con el modelo de inflamación de bolsa de aire de rata inducida por lipopolisacáridos descrito en el Ensayo 8.

35

Las Figuras 3A y 3B representan gráficos de líneas y de barras de las puntuaciones clínicas individuales para las patas traseras y delanteras y el AUC para la puntuación clínica, respectivamente, en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con un control o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

40

Las Figuras 3C y 3D representan gráficos de líneas y barras de puntuaciones clínicas individuales para patas traseras y delanteras, respectivamente, en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento del Ensayo 11.

Las Figuras 4A y 4B representan gráficos de líneas y de barras del volumen para las patas traseras y el AUC del volumen de pata, respectivamente, en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento del Ensayo 11.

45

Las Figuras 4C y 4D representan gráficos de líneas y barras del diámetro del tobillo para las patas traseras y el AUC del diámetro del tobillo, respectivamente, en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento del Ensayo 11.

Las Figuras 4E a 4G representan gráficos de barras de la puntuación histopatológica para la inhibición de la inflamación, el cartilago y el pannus, respectivamente, de todas las patas traseras y delanteras en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

50

La Figura 4H representa un gráfico de barras de la puntuación histopatológica total de todas las patas traseras y delanteras en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

55

La Figura 5 representa un gráfico de barras del porcentaje de incidencia de artritis en ratas Wistar con artritis inducida por colágeno tratadas con vehículo o 10 mg/kg/QD del Compuesto A1 de acuerdo con el procedimiento en el Ensayo 11.

Las Figuras 6A y 6B representan gráficos de barras que muestran el efecto antipsoriásico del Compuesto A1 (3, 10, 30 mg/kg) sobre psoriasis inducida por imiquimod en ratones Balb/c de acuerdo con el procedimiento del Ensayo 13.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique otra cosa.

- 5 Además, muchos de los grupos definidos en el presente documento pueden estar opcionalmente sustituidos. La lista de sustituyentes en la definición es ejemplar y no debe interpretarse como limitante de 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 lo tanto, pueden dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras formas estereoisoméricas que se pueden definir, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S). A menos que se especifique otra cosa, las presentes entidades químicas, composiciones farmacéuticas y métodos pretenden incluir todos los posibles isómeros, incluidas mezclas racémicas, formas ópticamente puras y mezclas intermedias. Por ejemplo, los ejemplos no limitantes de mezclas intermedias incluyen una mezcla de isómeros R: S o S: R en una relación de 10:90, 13:87, 17:83, 20:80, o 15 22:78. Los isómeros (R) y (S) ópticamente activos se pueden preparar usando sintones quirales o reactivos quirales, o se pueden resolver usando 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.

20 El término "tautómeros" se refiere a compuestos, que se caracterizan por una interconversión relativamente fácil de formas isoméricas en equilibrio. Se pretende que estos isómeros estén cubiertos por esta invención. Los "tautómeros" son isómeros estructuralmente distintos que se interconvierten por tautomerización. La "tautomerización" es una forma de isomerización e incluye la tautomerización prototrópica o de desplazamiento de protones, que se considera un subconjunto de la química ácido-base. La "tautomerización prototrópica" o la 25 "tautomerización por desplazamiento de protones" implica la migración de un protón acompañado de cambios en el orden de enlace, a menudo el intercambio de un enlace sencillo con un doble enlace adyacente. Cuando es posible la tautomerización (por ejemplo, en solución), se puede alcanzar un equilibrio químico de tautómeros. Un ejemplo de tautomerización es la tautomerización ceto-enol. Un ejemplo específico de tautomerización 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 fenol-ceto. Un ejemplo específico de tautomerización de fenol-ceto es la interconversión de 30 tautómeros de piridin-4-ol y piridin-4 (1H) -ona.

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 35 generalmente en Hardma, et al. (Eds.), Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª ed., págs. 11-16 (1996). Se proporciona un análisis extenso en Higuchi, et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14, ASCD Symposium Series, y en Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press (1987). Para ilustrar, los profármacos se pueden convertir en una forma farmacológicamente activa mediante hidrólisis de, por ejemplo, un enlace éster o amida, introduciendo o exponiendo 40 de este modo un grupo funcional en el producto resultante. Los profármacos se pueden diseñar para que reaccionen con un compuesto endógeno para formar un conjugado soluble en agua que mejore adicionalmente las propiedades farmacológicas del compuesto, por ejemplo, una semivida circulatoria aumentada. Como alternativa, los profármacos se pueden diseñar para someterse a una modificación covalente en un grupo funcional con, por ejemplo, ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. El conjugado resultante puede inactivarse y excretarse en la 45 orina, o hacerse más potente que el compuesto original. Los conjugados de alto peso molecular también pueden excretarse en la bilis, someterse a escisión enzimática y liberarse de nuevo a la circulación, aumentando de este modo eficazmente la semivida biológica del compuesto administrado originalmente.

El término "éster" se refiere a un compuesto, que se forma por reacción entre un ácido y un alcohol con eliminación 50 de agua. Un éster se puede representar mediante la fórmula general RCOOR' (donde R es un fármaco y R' es un grupo químico).

Adicionalmente, la presente invención también incluye los compuestos que difieren solo en presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos, por ejemplo, la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de 55 un carbono por carbono enriquecido en ¹³C o ¹⁴C.

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 estar radiomarcados con isótopos radiactivos, tales como, por ejemplo, tritio (³H), yodo-125 (¹²⁵I) o carbono-14 (¹⁴C).

Todas las variaciones isotópicas de los compuestos de la presente invención, ya sean radiactivos o no, se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

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, dicitclohexilamina, metformina, bencilamina, trialquilamina y tiamina; bases quirales tales como alquilfenilamina, glicinol y fenilglicol; sales de aminoácidos naturales tales como glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina, tirosina, cistina, cisteína, metionina, prolina, hidroxiprolina, histidina, ornitina, lisina, arginina y serina; sales de amonio cuaternario de los compuestos de la invención con haluros de alquilo, sulfatos de alquilo tales como MeI y (Me)₂SO₄; aminoácidos no naturales tales como D-isómeros o aminoácidos sustituidos; guanidina; y guanidina sustituida en la que los sustituyentes se seleccionan de nitro, amino, alquilo, alquenilo, alquinilo, sales de amonio o amonio sustituido y sales de aluminio. Las sales pueden incluir sales de adición de ácidos cuando sea apropiado, que pueden ser sulfatos, nitratos, fosfatos, percloratos, boratos, hidrohaluros, acetatos, tartratos, maleatos, citratos, fumaratos, succinatos, palmoatos, metanosulfonatos, benzoatos, salicilatos, bencenosulfonatos, ascorbato, glicerofosfatos y cetoglutaratos.

Cuando se usan en el presente documento intervalos para propiedades físicas, tal como peso molecular, o propiedades químicas, tal como fórmulas químicas, todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y formas de realización específicas en el mismo están destinadas incluirse. El término "aproximadamente" cuando se refiere a un número o intervalo numérico significa que el número o intervalo numérico referido es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico), y por lo tanto, el número o intervalo numérico puede variar, por ejemplo, entre el 1% y el 15% del número o intervalo numérico indicado. El término "que comprende" (y términos relacionados tales como "comprender" o "comprende" o "tener" o "incluir") incluye estas formas de realización, por ejemplo, una forma de realización de cualquier composición de materia, composición, método o proceso, o similares, que "consisten en" o "consisten esencialmente en" las características descritas.

Las siguientes abreviaturas y términos tienen los significados indicados: PI3-K = Fosfoinositida 3-cinasa; PI = fosfatidilinositol; SIDA = Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida; VIH = Virus de inmunodeficiencia humana; MeI = Yoduro de metilo; ND: No determinado.

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

El término "proliferación celular" se refiere a un fenómeno por el cual el número de células ha cambiado como resultado de la división. Este término también incluye el crecimiento celular mediante el cual ha cambiado la morfología celular (por ejemplo, ha aumentado de tamaño) en consonancia con una señal proliferativa.

Los términos "coadministración", "administrado en combinación con" y sus equivalentes gramaticales, como se usan en el presente documento, incluyen la administración de dos o más agentes a un animal de manera que ambos agentes y/o sus metabolitos están presentes en el animal al mismo tiempo. La coadministración incluye la administración simultánea en composiciones separadas, la administración en diferentes momentos en composiciones separadas, o la administración en una composición en la que ambos agentes están presentes.

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto descrito en el presente documento que es suficiente para realizar la aplicación prevista que incluye, pero sin limitación, 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 el sujeto y la afección de enfermedad que se trate, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la afección, la forma de administración y similares, lo que puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica. El término también se aplica a una dosis que inducirá una respuesta particular en las células diana, por ejemplo, la reducción de la adhesión plaquetaria y/o la migración celular. La dosis específica variará dependiendo de los compuestos particulares elegidos, el régimen de dosificación a seguir, si se administra en combinación con otros compuestos, el momento de la administración, el tejido al que se administra, y el sistema de administración física en el que se transporta.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento", "tratar" o "mejorar" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados incluyendo, pero sin limitación, un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o la mejora del trastorno subyacente que se está tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o

mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con el trastorno subyacente de manera que se observa una mejoría en el paciente, a pesar de que el paciente todavía puede estar afectado por el trastorno subyacente. Para el beneficio profiláctico, las composiciones pueden administrarse a un paciente con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que notifica uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso aunque no se haya realizado un diagnóstico de esta enfermedad.

Un "efecto terapéutico", como se usa ese término en el presente documento, incluye 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, retrasar o eliminar la aparición de síntomas de una enfermedad o afección, ralentizar, detener o revertir el avance 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 tanto en aplicaciones terapéuticas humana como en aplicaciones veterinarias. En algunas formas de realización, el paciente es un mamífero. En una forma de realización preferida, el paciente es un ser humano.

"Radioterapia" significa exponer a un paciente, usando métodos y composiciones de rutina conocidos por el profesional, a emisores de radiación tales como radionucleidos que emiten partículas alfa (por ejemplo, radionucleidos de actinio y torio), emisores de radiación de baja transferencia de energía lineal (LET) (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 estimulantes o inhibitoras se transmiten en y dentro de una célula para provocar una respuesta intracelular. Un modulador de una ruta de transducción de señal se refiere a un compuesto que modula la actividad de una o más proteínas celulares mapeadas en la misma ruta específica de transducción de señal. Un modulador puede aumentar (agonista) o suprimir (antagonista) la actividad de una molécula de señalización.

El término "inhibición selectiva" o "inhibir selectivamente" aplicados a un agente biológicamente activo se refieren a la capacidad del agente para reducir selectivamente la actividad de señalización diana en comparación con la actividad de señalización fuera del objetivo, mediante interacción directa o indirecta con la diana.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluye, pero sin limitación, cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, uno o más diluyentes adecuados, cargas, sales, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, emolientes, agentes humectantes, matrices de liberación controlada, colorantes/saporíferos, 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 principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas de la invención. También pueden incorporarse en las composiciones principios activos complementarios.

En otras formas de realización, los compuestos de la presente invención inhiben selectivamente uno o más miembros de las fosfatidilinositol 3-cinasas de tipo I o clase I (PI3-cinasa) 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 de tipo I, o un inhibidor que inhibe selectivamente una o más rutas de señalización mediadas por PI3-cinasa de tipo I, se puede entender como alternativa que se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibitora del 50% (CI_{50}) con respecto a una PI3-cinasa de tipo I dada, que es al menos 10 veces más baja, al menos 20 veces más baja, al menos 50 veces más baja, al menos 100 veces mayor más baja, o al menos 1000 veces más baja que la CI_{50} del inhibidor con respecto al resto de las otras PI3-cinasas de tipo I.

Como se usa en el presente documento, el término "inhibidor doble de PI3-cinasa δ/γ " e "inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ/γ " se refiere a un compuesto que inhibe la actividad tanto de la PI3-cinasa δ como de la isoforma γ más eficazmente que otras isoenzimas de la familia PI3K. Por lo tanto, un doble inhibidor de PI3-cinasa δ/γ 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 no selectivos de PI3K.

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

La "respuesta inflamatoria" como se usa en el presente documento, se caracteriza por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor (es decir, inflamación) y típicamente implica lesión o destrucción tisular. Una respuesta inflamatoria suele ser una respuesta protectora localizada provocada por una lesión o destrucción de los tejidos, que sirve para destruir, diluir o aislar (secuestrar) tanto el agente dañino como el tejido lesionado. Las respuestas inflamatorias se asocian notablemente con la afluencia de leucocitos y/o quimiotaxis de leucocitos (por ejemplo, neutrófilos). Las respuestas inflamatorias pueden ser el resultado de la infección con organismos y virus patógenos, medios no infecciosos, tal como traumatismo o reperfusión después de infarto de miocardio o ictus, respuestas inmunes a antígenos extraños, y enfermedades autoinmunes. Las respuestas inflamatorias susceptibles de tratamiento con los métodos y compuestos de acuerdo con la invención incluyen afecciones asociadas con reacciones del sistema de defensa específico, así como también afecciones asociadas con reacciones del sistema de defensa no específico.

Los métodos terapéuticos de la invención incluyen métodos para la mejora de las afecciones asociadas con la activación de células inflamatorias. "Activación de células inflamatorias" se refiere a la inducción por un estímulo (incluyendo, pero sin limitación, citocinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo, pero sin limitación, citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoïdes o aminas vasoactivas), o la expresión de la superficie celular de un número nuevo o aumentado de mediadores (incluyendo, pero sin limitación, antígenos de histocompatibilidad principales o moléculas de adhesión celular) en células inflamatorias (incluyendo, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (leucocitos polimorfonucleares incluyendo neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los expertos en la técnica apreciarán 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 autoinmune" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión tisular se asocia con respuestas humorales o mediadas por células a los propios constituyentes del cuerpo.

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

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

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

"Dermatitis" como se usa 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 previamente, el término "inhibidor selectivo dual de PI3-cinasa δ/γ " generalmente se refiere a un compuesto que inhibe la actividad de la isozima de PI3-cinasa δ y γ más eficazmente que otras isozimas de la familia PI3K. Las eficacias relativas de los compuestos como inhibidores de una actividad enzimática (u otra actividad biológica) pueden establecerse determinando las concentraciones a las que cada compuesto inhibe la actividad en un grado predefinido y luego comparando los resultados. Típicamente, la determinación preferida es la concentración que inhibe el 50% de la actividad en un ensayo bioquímico, es decir, la concentración inhibitoria del 50% o "CI₅₀". Las determinaciones de CI₅₀ se pueden lograr usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En general, una CI₅₀ puede determinarse midiendo la actividad de una enzima dada en presencia de un intervalo de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente se representan frente a las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra un 50% de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor de CI₅₀. De forma análoga, otras concentraciones inhibitorias se pueden definir a

través de determinaciones de actividad apropiadas. Por ejemplo, en algunos entornos puede ser deseable establecer una concentración inhibitoria del 90%, es decir, CI_{90} , etc.

- Por consiguiente, se puede entender que un inhibidor selectivo dual de PI3-cinasa δ/γ se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibitoria del 50% (CI_{50}) con respecto a 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 CI_{50} con respecto a cualquiera o todos los demás miembros de la familia PI3K de clase I. En una forma de realización alternativa de la invención, puede entenderse que el término inhibidor selectivo dual de PI3-cinasa δ/γ se refiere a un compuesto que presenta una CI_{50} con respecto a 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 CI_{50} con respecto a cualquiera o todos los demás miembros de la familia PI3K de clase I. Un inhibidor selectivo dual de PI3-cinasa δ/γ se administra típicamente en una cantidad tal que inhibe selectivamente tanto la actividad de PI3-cinasa δ como γ , como se ha descrito anteriormente.
- 15 En ciertas formas de realización, los compuestos de la presente invención presentan una inhibición de PI3-cinasa δ y γ casi igual (~1:1) o en una relación máxima de 1:5, es decir, el compuesto de la presente invención presenta casi valores de CI_{50} iguales tanto para la enzima PI3-cinasa δ como γ , o como máximo una diferencia de 3 a 8 veces entre las dos.
- 20 Los métodos de la invención pueden aplicarse a poblaciones celulares *in vivo* o *ex vivo*. "*In vivo*" significa dentro de un individuo vivo, como dentro de un animal o ser humano o en el cuerpo de un sujeto. En este contexto, los métodos de la invención pueden usarse 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 de células *in vitro* y muestras biológicas que incluyen, pero sin limitación, muestras de fluido o de tejido obtenidas de individuos. Dichas muestras se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica. Las muestras de fluido biológico ejemplares incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo, orina y saliva. Las muestras de tejido ejemplares incluyen tumores y biopsias de las mismas. En este contexto, la invención se puede usar para una diversidad de propósitos, incluyendo fines terapéuticos y experimentales. Por ejemplo, la invención puede usarse *ex vivo* o *in vitro* para determinar el programa óptimo y/o la dosificación de la administración de un inhibidor selectivo de PI3-cinasa δ para una indicación dada, tipo de célula, individuo y otros parámetros. La información obtenida de dicho uso puede usarse con fines experimentales o de diagnóstico o en la clínica para establecer protocolos para el tratamiento *in vivo*. Otros usos *ex vivo* para los cuales la invención puede ser adecuada se describen a continuación o serán evidentes para los expertos en la técnica.
- 35 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, cada una de las cuales se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Composiciones Farmacéuticas

- 40 La presente invención también 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 forma de realización, la composición farmacéutica incluye una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más compuestos de la presente invención. La composición farmacéutica puede incluir uno o más principios activos adicionales como se describe en el presente documento.

Los vehículos y/o excipientes farmacéuticos se pueden seleccionar de, por ejemplo, diluyentes, cargas, sales, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, emolientes, agentes humectantes, matrices de liberación controlada, colorantes, saporíferos, tampones, estabilizantes, solubilizantes y combinaciones de los mismos.

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en solitario o en combinación con

uno o más de agentes activos diferentes. Cuando se desee, los compuestos objeto y otros agentes se pueden mezclar en una preparación, o ambos componentes se pueden formular en preparaciones separadas para usarlos en combinación por separado o al mismo tiempo.

- 5 Los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía que permita la administración de los compuestos al sitio de acción, tal como por vía oral, intranasal, tópica (por ejemplo, transdérmica), intraduodenal, parenteral (incluyendo por vía intravenosa, intraarterial, intramuscular, intravascularal, intraperitoneal o mediante inyección o infusión), intradérmica, intramamaria, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar (por ejemplo, fármacos en aerosol) o subcutánea (incluyendo la administración de
- 10 depósito para liberación a largo plazo, por ejemplo, incrustado bajo la cápsula esplénica, el cerebro, o en la córnea), sublingual, anal, rectal, vaginal o mediante implantación quirúrgica (por ejemplo, incrustado debajo de la cápsula esplénica, el cerebro, o en la córnea).

Las composiciones pueden administrarse en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, o pueden estar en polvo

15 seco, tal como una forma liofilizada. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse en formas convenientes para la administración, incluyendo, por ejemplo, formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, sobrecitos, sellos, gelatinas, papeles, comprimidos, supositorios, gránulos, píldoras, trociscos y pastillas. El tipo de envase dependerá de la ruta de administración deseada. También se contemplan formulaciones de liberación sostenida implantables, como son las formulaciones transdérmicas.

20

Procedimientos de tratamiento

La cantidad del compuesto a administrar depende del mamífero que se está tratando, la gravedad del trastorno o afección, la velocidad de administración, la disposición del compuesto y el criterio del médico que prescribe. Sin

25 embargo, una dosificación eficaz está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 35 mg/kg/día, en dosis únicas o divididas. Para un ser humano de 70 kg, esto sería de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 7 g/día, preferiblemente de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 2,5 g/día. Una cantidad eficaz de un compuesto de la invención se puede administrar en dosis únicas o múltiples (por ejemplo, dos veces o tres veces al día).

30

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

Los compuestos de la invención pueden formularse o administrarse junto con otros agentes que actúan para aliviar

35 los síntomas de afecciones inflamatorias tales como la encefalomielitis, el asma y las otras enfermedades descritas en el presente documento. Estos agentes incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

Ejemplos

40 Los ejemplos y las preparaciones que se proporcionan a continuación ilustran y ejemplifican adicionalmente los compuestos de la presente invención y los métodos de preparación de dichos compuestos. Debe entenderse que el alcance de la presente invención no está limitado en modo alguno por el alcance de los siguientes ejemplos y preparaciones. En los ejemplos siguientes, las moléculas con un único centro quiral, a menos que se indique lo contrario, existen como una mezcla racémica. Estas moléculas con dos o más centros quirales, a menos que se

45 indique lo contrario, existen como una mezcla racémica de diastereómeros. Los enantiómeros/diastereómeros individuales se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Los intermedios descritos en el presente documento pueden prepararse mediante los métodos descritos en las Publicaciones Internacionales N.º WO 11/055215 y WO 12/151525, ambas de las cuales se incorporan por la

50 presente por referencia.

Intermedio 1: N-(5-bromo-2-metoxifenil)metanosulfonamida: A una solución de 5-bromo-2-metoxianilina (1,00 g, 4,94 mmol) en diclorometano (10 ml), se le añadió piridina (0,800 ml, 9,89 mmol) y se enfrió a 0°C. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,40 ml, 5,19 mmol) y se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se

55 extrajo con acetato de etilo, se secó sobre sulfato sódico anhidro y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se sometió a cromatografía con acetato de etilo : éter de petróleo para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color rojizo (1,20 g, 87%).

Intermedio 2: N-(2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanosulfonamida: Se añadieron

acetato potásico (0,841 g, 8,57 mmol) y bis(pinacolato)diboro (1,190 g, 4,71 mmol) a una solución del intermedio 1 (1,20 g, 4,28 mmol) en dioxano (17,5 ml) y la solución se desgasificó durante 30 min. Se añadió [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II).CH₂Cl₂ (0,104 g, 0,128 mmol) en una atmósfera de nitrógeno y se calentó a 80°C. Después de 2 h, la mezcla de reacción se filtró a través de celite 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 (1,00 g, 71%). ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7,91 (d, *J* = 1,2Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 8,1, 1,2Hz, 1H), 6,92 (d, *J* = 8,1Hz, 1H), 6,73 (s, 1H), 3,91 (s, 3H), 2,98 (s, 3H), 1,32 (s, 12H).

10 **Intermedio 3: (S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona:** (S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona: A una solución de (R)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxi)etil-4H-cromen-4-ona (0,500 g, 1,64 mmol) en THF (5 ml), se le añadieron 3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina (0,564 g, 1,97 mmol) y trifenilfosfina (0,649 g, 2,47 mmol) seguido de la adición de azodicarboxilato de diisopropilo (0,50 ml, 2,47 mmol). Puede prepararse ((R)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxi)etil-4H-cromen-4-ona como se describe para los Intermedios 23, 25, y 26 en la Publicación Internacional N.º WO 2012/0151525.). Después de 4 h a temperatura ambiente, la mezcla se concentró y el residuo 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 pardo (0,270 g, 29%). ¹H RMN (δ ppm, DMSO-d₆, 400 MHz): 8,04 (s, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,63-7,50 (m, 3H), 7,29 (m, 2H), 7,06 (dt, *J* = 8,7, 2,2Hz, 1H), 6,94 (m, 2H), 6,75 (dd, *J* = 8,1, 2,1Hz, 1H), 5,95 (c, *J* = 7,0Hz, 1H), 4,98 (s, 2H), 3,81 (s, 3H), 1,86 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H).

15 **Intermedio 4: (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona:** (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona: A una solución del Intermedio 3 (0,260 g, 0,455 mmol) en etanol (5 ml), se le añadió Ni Raney (0,130 g) y se hidrogenó a 20 psi a 50°C durante 24 h. La mezcla de reacción se pasó a través de un lecho de celite y se concentró para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (0,150 g, 60%). Masa: 540,8 (M⁺).

30 Ejemplo A

N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida

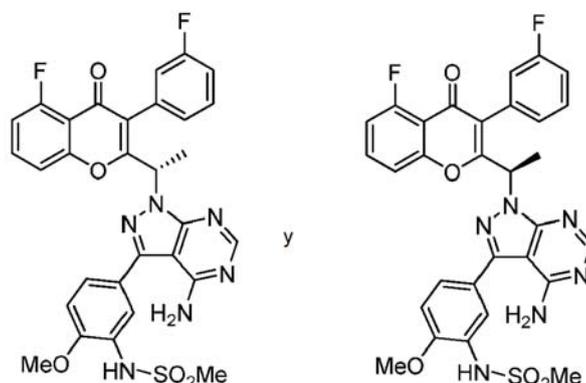
35 A una solución de 2-(1-(4-amino-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (0,200 g, 0,366 mmol) en DME (2,1 ml) y agua (0,67 ml), se le añadieron el intermedio 2 (0,179 g, 0,550 mmol) y carbonato sódico (0,116 g, 1,10 mmol) y el sistema se desgasificó durante 30 min. Puede prepararse 2-(1-(4-amino-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona como se describe para los Intermedios 23, 25, y 26 en la Publicación Internacional N.º WO 2012/0151525). Se añadió bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (0,059 g, 0,075 mmol) y se mantuvo en irradiación de microondas (potencia del microondas = 100 W, temperatura = 100°C) durante 45 min. La mezcla de reacción se filtró sobre Celite, se concentró y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida. 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 pardo (0,080 g, 35%). P.F.: 216-218 °C. ¹H RMN (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,20 (s, 1H), 7,73 (s, 1H), 7,53 (m, 2H), 7,31 (m, 2H), 7,07-6,73 (m, 6H), 6,07 (c, *J* = 6,2 Hz, 1H), 3,98 (s, 3H), 3,14 (s, 3H), 2,01 (d, *J* = 6,0Hz, 3H).

Ejemplo A1 y A2

50 Método A

(S)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida

55 **y (R)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida**



Los isómeros enantioméricamente puros se separaron en condiciones de SFC preparativa (fluidos supercríticos) a partir de N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida (0,500 g) en una columna CHIRALPAK AS-H (250 x 30 mm; 5 μ m) usando metanol : CO₂ (55:45) como la fase móvil a un caudal de 80 g/min.

10 Ejemplo A1 (isómero S): Sólido de color pardo (0,247 g). Exceso enantiomérico: 97,4%. Tiempo de retención: 2,14 min. Masa: 619,1 (M⁺+1). P.F.: 156-158°C.

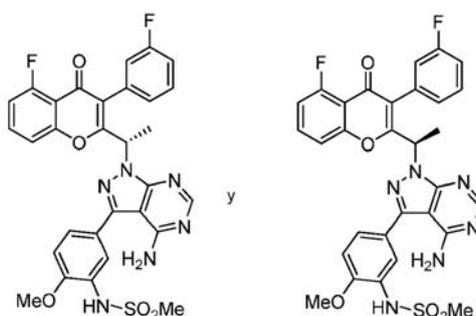
Ejemplo A2 (isómero R): Sólido de color pardo (0,182 g). Exceso enantiomérico: 99,3%. T. de retención: 3,43 min. Masa: 619,1 (M⁺+1). P.F.: 168-171°C.

Método A1

15 **(S)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida**

y **(R)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida**

20



25 Los isómeros enantioméricamente puros se separaron en condiciones de SFC preparativa (fluidos supercríticos) a partir de N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida (15,0 g) en una columna CHIRALPAK AS-H (250 x 20 mm; 5 μ m) usando metanol : CO₂ (45:55) como la fase móvil a un caudal de 120 g/min.

Ejemplo A1 (isómero S): Exceso enantiomérico: 100 %. Tiempo de retención: 2,21 min. Masa: 619,1 (M⁺+1). P.F.: 175-178°C. Rotación óptica específica (C = 1 en cloroformo, a 25°C) : $[\alpha]_D = + 147,16$.

30

Ejemplo A2 (isómero R): Exceso enantiomérico: 99,3%. T. de retención: 3,72 min. Masa: 619,1 (M⁺+1). P.F.: 154-157°C. Rotación óptica específica (C = 1 en cloroformo, a 25°C) : $[\alpha]_D = - 159,54$.

Procedimiento B

Ejemplo A1**(S)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida**

A una solución del Intermedio **4** (0,500 g, 0,923 mmol) en diclorometano (5 ml) enfriado a 0°C se le añadió piridina (0,200 ml, 1,84 mmol) y se agitó durante 10 min. Se añadió cloruro de metanosulfonilo (0,100 ml, 0,923 mmol) agitado durante 30 min. La mezcla de reacción se inactivó con agua, se extrajo con diclorometano y se secó sobre sulfato sódico. El producto en bruto se sometió a cromatografía en columna con metanol:diclorometano para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido de color blanquecino (0,240 g, 42%). P.F.: 211-213°C. ¹H RMN (δ ppm, DMSO-d₆, 400 MHz): 9,15 (s, 1H), 8,06 (s, 1H), 7,83 (m, 1H), 7,49 (m, 4H), 7,28 (m, 4H), 7,08 (dt, *J* = 8,6,1,7 Hz, 1H), 6,92 (s, 2H), 5,98 (c, *J* = 6,9 Hz, 1H), 3,88 (s, 3H), 2,99 (s, 3H), 1,88 (d, *J* = 7,0 Hz, 3H). Exceso enantiomérico: 85,4% según se determinó por HPLC en una columna chiralpak AS-3R, enriquecida en el isómero de elución rápida (tiempo de retención = 7,46 min).

Estabilidad metabólica

Los estudios de estabilidad metabólica se realizaron en los Compuestos A, A1, y A2, así como el Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525 usando microsomas de hígado de ratón, rata, perro, mono y ser humano. El protocolo para los estudios con microsomas de hígado de ratón, rata y ser humano (todos de BD Gentest, EE. UU.) se proporciona a continuación. Se preincubaron 0,4 mg de proteína con NADPH (cofactor) 2 mM en tampón fosfato (pH ~7,4) durante 15 minutos a 37°C y después se añadieron con el elemento de ensayo 1 μM y se incubaron durante 60 minutos más por triplicado. La mezcla de reacción se terminó con metanol que contenía un patrón interno y se centrifugó adicionalmente para analizar el elemento de ensayo que quedaba en el sobrenadante por LC-MS/MS. El porcentaje de compuesto original restante se calculó en comparación con muestras similares terminadas a los 0 minutos. Los resultados se proporcionan en la Tabla 1 a continuación.

Los datos de estabilidad metabólica para el Compuesto A1 indican que presenta un perfil farmacocinético superior.

Tabla 1

Compuesto	Estabilidad metabólica en microsomas de hígado				
	Ratón	Rata	Perro	Mono	Ser humano
Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525	85,0	73,3	ND	ND	70,4
Compuesto A	96	91	64,3	42,3	69,7
Compuesto A1	85,9	94,2	83,5	78,8	95,7
Compuesto A2	68,9	79,5	52,3	1,9	60,2
ND - No determinado					

Unión a proteínas

A continuación, se proporciona el procedimiento para medir la unión a proteínas plasmáticas (utilizando un método de diálisis en equilibrio). Se transfirieron 745 μl de plasma a un tubo de microcentrífuga de 2 ml. A éste se le añadieron 5 μl de Compuesto A1 (150 μM). Las muestras se mezclaron en el agitador vorticial de mesa durante 2 minutos. Se transfirieron 50 μl de plasma (n = 2) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml previamente etiquetado tratado como muestra de 0 horas.

La muestra de plasma restante de 650 μl se incubó durante 30 minutos a 37°C en un baño de agua. Después de 30 minutos de incubación, se eliminaron 50 μl de plasma (n = 2) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml previamente marcado tratado como muestra de 0,5 horas. Se transfirieron 200 μl de la muestra de plasma (n = 2) a la cámara de la muestra, que se indicó mediante el anillo rojo. El inserto rojo se colocó en la placa de base y se transfirieron 350 μl de tampón a la cámara del tampón. Las placas se incubaron a 37°C a aproximadamente 100 RPM en un agitador orbital o 20 RPM en un agitador ascendente y descendente durante 4 horas. 50 μl de muestra posterior a la diálisis del tampón y las cámaras de plasma se transfirieron a un tubo microcentrifugado premarcado. Se añadieron 50 μl de plasma a las muestras de tampón y un volumen igual de tampón (tampón KH₂PO₄ pH 7,4) a las muestras de plasma recogidas. Se añadieron 150 μl de metanol que contenía patrón interno (Tolbutamida 250 ng/ml) para precipitar la proteína y liberar el compuesto. Las muestras se agitaron vorticialmente durante 3 minutos en un agitador vorticial de mesa y se centrifugaron durante 5 minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se sometió a análisis por LC-MS/MS.

Los datos de unión a proteínas plasmáticas para el Compuesto A1 se proporcionan en la Tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Unión de proteínas (%)				
Ratón	Rata	Perro	Mono	Ser humano
97,61	99,04	95,85	94,71	97,24

5 Farmacocinética

La biodisponibilidad oral del Compuesto A1 (base libre) se evaluó en ratas y ratones. El protocolo para los estudios de farmacocinética en ratas se proporciona a continuación.

- 10 Todos los animales se mantuvieron en ayunas durante la noche (12 horas) antes de la dosificación y se continuó hasta 4,0 horas después de la administración del elemento de ensayo. Las formulaciones de los elementos de ensayo se prepararon en Tween 80 al 1% y medio al 99% (0,5% de metilcelulosa, 4000 cPs, pH 2,2). Las muestras de sangre (150 µl de cada animal) se recogieron del seno orbital y se colocaron en un tubo de microcentrifuga que contenía EDTA disódico como anticoagulante. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente con una
- 15 velocidad de 1000 g durante 10 minutos a 4°C y las muestras de plasma separadas se congelaron a menos de -80°C y se almacenaron hasta el análisis. Las concentraciones del elemento de ensayo en todas las formulaciones se analizaron por HPLC. Las concentraciones plasmáticas del elemento de ensayo en todas las muestras se analizaron por LC-MS/MS. Los parámetros farmacocinéticos ($C_{máx}$, AUC_{0-t} , $T_{máx}$, y $t_{1/2}$) se estimaron utilizando el software WinNonlin. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3 para el Compuesto A, A1 y el Ejemplo 128 del documento
- 20 WO 2012/151525 en ratas y el Compuesto A1 en ratones.

Tabla 3

Compuesto	Unidades	Ej. 128 del documento WO 2012/151525	Compuesto A	Compuesto A1	Compuesto A1
Animal		Rata			Ratones
Ruta		Oral	Oral	Oral	Oral
Dosis	mg/kg	10	10	10	10
N		2	2	4	3
$C_{máx}$	µM	0,68	1,02	11,38	3,78
AUC_{0-t}	µM·h	2,01	7,95	97,76	7,49
$T_{máx}$	h	0,83	2,67	1,83	0,50
$t_{1/2}$	h	1,56	4,52	2,45	1,45

- Los Compuestos A y A1 mostraron perfiles farmacocinéticos superiores en comparación con el Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525. Por ejemplo, el Compuesto A mostró un aumento de -1,5 veces en $C_{máx}$, un aumento de ~4 veces en AUC_{0-t} , y un aumento de ~2,8 veces en $t_{1/2}$ en comparación con el Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525. El Compuesto A1 mostró un aumento de -16 veces en $C_{máx}$, un aumento de 48 veces en AUC_{0-t} , y un aumento de ~1,6 veces en $t_{1/2}$ en comparación con el Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525.

30 Ensayos biológicos

Las propiedades farmacológicas de los compuestos descritos en el presente documento pueden confirmarse mediante una serie de ensayos farmacológicos, como se ilustra a continuación.

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

- Las fosfoinositida 3 cinasas (PI3K) pertenecen a una clase de cinasas lipídicas que desempeñan un papel crítico en la regulación de varios procesos celulares clave. Las PI3K son capaces de fosforilar la posición 3-hidroxi de los fosfoinositoles, generando de este modo segundos mensajeros implicados en eventos de señalización aguas abajo.
- 40 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 fosfotidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) por las isoformas de PI3K, tales como α , β , γ o δ .

- La actividad de la isoforma de PI3K para α , β , γ o δ se determinó usando un kit de ensayo HTRF™ de PI3K humana (Millipore, Billerica, MA) con modificaciones. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. 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 contenía 14,5 µl de mezcla de tampón 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 30 minutos más. La reacción se terminó añadiendo 5 µl/pocillo de solución de parada (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 HRTF 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 ms con retardo de recuento de 50 ms. Los resultados para los Compuestos A, A1 y A2 se muestran en la Tabla 4 a continuación. Los datos comparativos para el Compuesto A1 y el Ejemplo 128 del documento de patente WO2012/151525 se proporcionan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 4

Compuesto	CI ₅₀ (nM)			
	PI3Kδ	PI3Kα	PI3Kβ	PI3Kγ
A	102,8	ND	ND	82,94
A1	30,46	>10000	1359	48,72
A2	92,95	ND	ND	>10 µM

ND: No determinado

Tabla 5

Perfil de selectividad				
Ensayo	CI ₅₀ (nM)		Factor de selectividad	
	PI3Kδ	PI3Kγ	PI3Kα	PI3Kβ
Ejemplo 128 del documento WO 2012/151525	76,01	70,70	NC (38,29*)	NC (51,04*)
Compuesto A	102,8	82,94	ND	ND
Compuesto A1	30,46	48,72	>329 (23,02**)	>45 (46,8*) (CI ₅₀ = 1359 nM)
Compuesto A2	92,95	>10000	ND	ND

* % de inhibición a 1µM; ** % de inhibición a 10 µM; NC-No calculado y ND: No determinado

15

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

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

El Compuesto A1 causó una reducción en la viabilidad celular del linfoma T (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, Hut-78 y HuT-102) con valores de CI₅₀ que variaban de 2,5-12,8 µM para el intervalo de dosis ensayado. Además, el compuesto A1 no mostró ninguna citotoxicidad aparente durante el período de incubación de 72 horas.

30

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

Se incubaron células MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM, y Hut-78 con concentraciones deseadas de compuesto durante 48 horas. Las células se lisaron y pAKT se determinó mediante transferencia de Western. Las bandas se cuantificaron utilizando ImageJ y se normalizaron con respecto a actina.

El Compuesto A1 causó una reducción en la expresión de pAKT en líneas celulares de linfoma T (MOLT-4, Jurkat, CCRF-CEM y Hut-78) con valores de CE₅₀ que variaban de 0,02-1,6 µM para el intervalo de dosis ensayado.

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

La señalización de PI3K δ y γ en basófilos manifestada por una alteración de la expresión de CD63 inducida por anti-FcεR1 o fMLP es un marcador farmacodinámico útil determinado utilizando el kit Flow2CAST® (Buhlmann Laboratories, Suiza). El procedimiento de ensayo implica las siguientes etapas:

- Mezclar la muestra de sangre anticoagulada invirtiendo el tubo de venopunción varias veces;
- Preparar tubos de polipropileno o poliestireno de 3,5 ml nuevos y libres de pirógenos, adecuados para las mediciones de citometría de flujo;
- 5 - Añadir 49 µl de sangre entera del paciente a cada tubo;
- Añadir 1 µl de DMSO al 10% (fondo) o compuesto de ensayo (DMSO al 10%) a los tubos asignados y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos;
- Pipetear 50 µl del tampón de estimulación (fondo) o anti-FcεRI Ab o fMLP en cada tubo;
- 10 - Añadir 100 µl de tampón de estimulación a cada tubo;
- Mezclar suavemente. Añadir 20 µl 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. (el uso de una incubadora llevará unos 10 minutos más de tiempo de incubación debido a una transferencia de calor menos eficiente);
- 15 - Añadir 2 ml de reactivo de lisado 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 µl de tampón de lavado; y
- 20 - Agitar vorticialmente de forma suave y adquirir los datos del citómetro de flujo en el mismo día.

El porcentaje de células positivas para CD63 dentro de la población basófila cerrada se determinó en diferentes grupos de tratamiento y se normalizó con respecto al control de vehículo.

- 25 El Compuesto A1 presentó una CE_{50} de <30 nM para FcεR1(PI3K δ) y una CI_{50} de <70 nM para fMLP (PI3K γ)(n = 1).

Ensayo 4A: Actividad celular que demuestra la selectividad del Compuesto A1 hacia las isoformas PI3K Delta y PI3K gamma

- 30 Ensayo 4A1: Proliferación de linfocitos B inducida por anti-IgM (para selectividad de PI3Kδ)

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial inhibitorio del Compuesto A1 en la proliferación de linfocitos B humanos inducida por anti-IgM.

- 35 Colocación en placas y tratamiento

- Los linfocitos B aislados se resuspendieron a $1,0 \times 10^6$ células por ml. Se añadieron 100 µl de suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se mantuvieron los triplicados.
- 40 - Se añadieron 50 µl de dilución del fármaco y se mezclaron bien. Se mantuvieron un blanco DMSO y un blanco inductor.
- La placa tratada se incubó durante 30 minutos a 37°C, CO₂ al 5% y luego se añadieron 50 µl de inductor 4X y se mezclaron mediante pipeteo.
- La placa se incubó a 37°C, CO₂ al 5% durante 72 horas.
- 45 - El medio se aspiró y se añadieron 150 µl de DMSO para disolver los cristales de formazán.
- La absorbancia se leyó a A₅₆₀ y A₆₄₀ nm.

Los datos demuestran el potencial inhibitorio del Compuesto A1 en la inducción mediada por PI3Kδ de la proliferación de linfocitos B humanos. Véase, por ejemplo, Baeker et al., Journal of Immunology, 134: 3532-3538, 50 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 55 LPA mediada por PI3Kβ cinasa en fibroblastos 3T3.

- Las células 3T3 se trataron con las concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de LPA 2X de manera que la concentración final fue de 5 µM y se incubó durante 5 minutos.

- El medio se descartó 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 minutos.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se mantuvo a -80°C hasta el análisis.
- Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western utilizando pAKT (S473) como IgG-HRP primario y anti-conejo como anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1.42q (NIH, EE. UU.) y se normalizó con respecto a Actina (control de carga). Los datos se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

10 Los resultados demuestran la selectividad del Compuesto A1 sobre 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 PI3Ky)

15 El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del Compuesto A1 en la fosforilación de AktS473 inducida por c5a mediada por PI3Ky cinasa en macrófagos RAW 264.7.

- Las células RAW 264.7 se trataron con las concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de c5a 2X de manera que la concentración final fue de 50 ng/ml y se incubó durante 15 minutos.
- El medio se descartó 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 minutos.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta el análisis.
- Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western utilizando pAKT (S473) como IgG-HRP primario y anti-conejo como anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1.42q (NIH, EE. UU.) y se normalizó con respecto a Actina (control de carga). Los datos se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

30 En la inhibición de pAktS473, un marcador aguas abajo de la señalización de PI3Ky sugiere un papel para el Compuesto A1 en las rutas oncogénicas reguladas por Akt en células RAW 264.7 inducidas por c5a. Véase, To et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 182, 897-904, 2010.

Ensayo 4A4: Fosforilación de Akt inducida por PDGF en células 3T3 (para selectividad PI3K α)

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

- Las células 3T3 se trataron con las concentraciones deseadas del compuesto de ensayo durante 15 minutos. Se añadió 1 ml de PDGF 2X de manera que la concentración final fue de 20 ng/ml y se incubó durante 10 minutos.
- El medio se descartó 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 minutos.
- Las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se recogió y se almacenó a -80°C hasta el análisis.
- Las muestras se analizaron mediante transferencia de Western utilizando pAKT (S473) como IgG-HRP primario y anti-conejo como anticuerpo secundario.
- La intensidad de las bandas se determinó utilizando ImageJ 1.42q (NIH, EE. UU.) y se normalizó con respecto a Actina (control de carga). Los datos se representaron gráficamente utilizando GraphPad Prism (versión 5.02).

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

La Tabla 6 a continuación resume los resultados de los ensayos 4A1-4A4.

55

Tabla 6

ACTIVIDAD CELULAR QUE DEMUESTRA LA SELECTIVIDAD DEL COMPUESTO A1 HACIA LAS ISOFORMAS PI3K δ Y PI3K γ	
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)	1324 nM
CI ₅₀ celular de PI3K delta (proliferación de linfocitos B humanos inducida por anti-IgM)	11,03 nM
CI ₅₀ celular de PI3K gamma (pAKT inducida por c5a en macrófagos RAW)	51,73 nM

Ensayo 5: Inhibición de la apoptosis en líneas celulares leucémicas

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

- Sembrar células leucémicas a una densidad de 1 x 10⁶ células/pocillo en una placa de 6 pocillos
- Añadir el compuesto de ensayo/DMSO a las concentraciones deseadas
- Incubar la placa durante 24 horas a 37°C en una incubadora con 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 moviendo ligeramente los tubos
- Incubar los tubos durante 1 hora a 37°C bajo CO₂ al 5%
- Añadir 2 ml de tampón de lavado 1X a cada tubo y mezclar
- 15 - Centrifugar las células a <400 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Con cuidado, retirar y desechar el sobrenadante, y agitar suavemente el sedimento celular para interrumpir cualquier agrupamiento entre células.
- Volver a suspender el sedimento celular en 300 µl de tampón de lavado 1X.
- Colocar 100 µl de cada suspensión celular en cada uno de los dos pocillos de una placa de microtitulación de color negro. Evita la creación de burbujas.
- 20 - Leer la absorbancia de cada micropocillo utilizando una longitud de onda de excitación de 490 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.
- Se calculará el porcentaje de aumento en la actividad de la caspasa-3 manifestada por un aumento en la fluorescencia en comparación con el blanco de control.

25 Ensayo 6A: Ensayo de citocinas en PBMC humanas

El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial inhibitorio del Compuesto A1 en la liberación de citocinas inducida por antígeno en PBMC humanas

30 Colocación en placas y tratamiento

- La sangre entera humana heparinizada se diluyó 1:1 con PBS, se colocó en medio de separación de leucocitos y se centrifugó a 400 g durante 40 minutos.
- Se retiró la capa leucocitaria y se lavó con PBS.
- 35 - Se colocaron en placas 0,15 * 10⁶ de PBMC en 100 µl por pocillo en medio RPMI y se incubaron durante 2 h.
- Se añadieron 50 µl de 3X de la dilución del compuesto en medio y se incubaron durante 15 min.
- TNFα: inducido con 50 µl de LPS en RPMI, de modo que la concentración final fue de 1 µg/ml. El sobrenadante se recogió a las 6 horas.
- 40 - IL-2: inducido con 50 µl de PHA en RPMI, de modo que la concentración final fue de 20 µg/ml. El sobrenadante se recogió a las 24 horas.
- IL-4: inducido con 50 µl de PHA en RPMI, de modo que la concentración final fue de 20 µg/ml. El sobrenadante se recogió a las 48 horas.
- El ELISA se realizó utilizando kits de eBioscience.
- 45 - La CE₅₀ se calculó usando GraphPad Prism 5.

Los valores de CE₅₀ se calcularon a partir de 2-3 experimentos independientes. El Compuesto A1 inhibió el TNFα, IL-2, y IL-4 inducido con antígeno con una CE₅₀ de 7,1, 9,5, y 3,5 nM, respectivamente.

50 Ensayo 6B: Inhibición de CD19 o CD45R inducido por LPS en sangre entera humana o de ratón

Se determinó el efecto del Compuesto A1 en la modulación de la proliferación activada por el receptor de linfocitos B (BCR) de linfocitos B humanos o de ratón. CD19 es una proteína presente en los linfocitos B desde las primeras células de linaje B reconocibles durante el desarrollo hasta los blastos de linfocitos B, pero sin embargo se pierde en la maduración de las células plasmáticas. LPS es una endotoxina y un componente principal de los microbios ambientales con una potente actividad mitogénica en los linfocitos B a través de la ruta de señalización de BCR.

La sangre entera humana diluida se trató con DMSO o con las concentraciones deseadas de Compuesto A1. Las muestras se indujeron con LPS 15 minutos después de la adición del compuesto y se incubaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Las células positivas para CD45 y CD19 se determinaron mediante citometría de flujo y los datos se expresan como porcentaje de células positivas para CD19 en la población total. El tratamiento con el Compuesto A1 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de linfocitos B de sangre entera humana inducida por LPS (CE₅₀ = 117,7 nM) manifestada por una reducción en la expresión de CD19.

De forma similar a CD19, CD45R (B220) se expresa en linfocitos B de ratón a lo largo de su desarrollo a partir de estadios pro-B tempranos en adelante y se regula negativamente por diferenciación terminal con respecto a células plasmáticas. Brevemente, se trató sangre entera de ratón diluida con DMSO o concentraciones deseadas de Compuesto A1. Las muestras se indujeron con LPS 15 minutos después de la adición del compuesto y se incubaron durante 72 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Las células positivas para CD45 y CD45R se determinaron mediante citometría de flujo. Los datos se expresan como porcentaje de células positivas para CD45R en la población total. De acuerdo con los datos de proliferación de células CD19+, el tratamiento con el Compuesto A1 dio como resultado una inhibición dependiente de la dosis de la proliferación de linfocitos B de sangre entera de ratón inducida por LPS (CE₅₀ = 128,2 nM) que se manifiesta por una reducción en la expresión de CD45R.

Ensayo 6C: Inhibición de la fosforilación de AKT en esplenocitos aislados de ratón

La ruta de PI3K está regulada aguas abajo por AKT, una serina-treonina cinasa que modula varios procesos oncogénicos, tal como la proliferación celular, el crecimiento y la supervivencia. Debido a que el bazo es un repertorio de vastas cantidades de linfocitos B y T, la inhibición de la fosforilación de AKT inducida por LPS se determinó *ex vivo* usando esplenocitos de ratón aislados. Las células se colocaron en placas y se incubaron con una concentración deseada del Compuesto A1 durante 15 minutos seguido de inducción con LPS (20 µg/ml) durante 30 minutos. Después de la inducción, las células se lisaron y pAKT se determinó mediante ELISA utilizando un par de anticuerpos de captura/detección pAKT^{S473} y un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP. Se obtuvieron valores de absorbancia restada en blanco para calcular el porcentaje de inhibición de pAKT en muestras de ensayo. El Compuesto A1 causó una reducción dependiente de la dosis (CE₅₀ = 347,4 nM) en la fosforilación del marcador aguas abajo, AKT, a bajas concentraciones, elucidando de este modo la ruta de señalización.

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

Es probable que un reclutamiento exagerado y la posterior activación de neutrófilos sea importante para el desarrollo y el transcurso de varias enfermedades inflamatorias en las vías respiratorias y los pulmones, tal 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, tal como la elastasa de los neutrófilos y los radicales libres de oxígeno. Cuando se liberan, estos compuestos pueden causar broncoconstricción, hiperreactividad bronquial, hipersecreción, daño epitelial y remodelación de tejidos en las vías respiratorias.

Después del periodo de cuarentena, los animales en ayunas se asignaron al azar y se dividieron en varios grupos en función de su peso corporal. El compuesto de ensayo (Compuesto A1) se preparó como una suspensión en un vehículo que consistía en metilcelulosa al 0,5% en el que Tween 80 es un agente de suspensión. El compuesto o vehículo se administró por sonda oral en un volumen de 10 ml/kg. Se anestesiaron ratas hembra Wistar con ketamina y se administró por vía intratraqueal una solución de LPS una hora después de la administración del compuesto a una dosis de 1 mg/kg. 6 horas después de la instilación de LPS, los animales se desangraron bajo anestesia y luego se canuló la tráquea y se lavaron los pulmones con alícuotas de 5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de una cánula traqueal (volumen total 20 ml). El fluido de lavado broncoalveolar (BAL) se almacenó a 2-8°C hasta que se analizó el recuento total de células y leucocitos diferenciales. El fluido broncoalveolar se centrifugó (500 x g durante 10 minutos) 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 BAL o sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustó a 1×10^6 células/ml. El recuento de células diferenciales se calculó manualmente. Cien microlitros de la suspensión celular se centrifugaron utilizando un Cytospin 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñó con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y se observaron microscópicamente los portaobjetos para identificar 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. Se calculó el número de eosinófilos en cada BALf o sangre.

El Compuesto A1 mostró una reducción de la infiltración de neutrófilos en los pulmones con una inhibición del 65,29% a 10 mg/kg en comparación con el grupo control, lo que sugiere un papel terapéutico en los trastornos inflamatorios. Los resultados se muestran en la Figura 1.

5 Ensayo 8: Modelo de inflamación de bolsa de aire de rata inducida por lipopolisacáridos

Las ratas Wistar hembra (175-200 g) se aclimataron durante siete días antes del comienzo del experimento. Los animales se distribuyeron al azar en varios grupos de acuerdo con su peso corporal. Los animales se anestesiaron con éter y se hicieron bolsas de aire subcutáneas inyectando 20 ml de aire estéril debajo de la piel en el área
10 intraescapular (día 0) y se mantuvieron con una segunda inyección de 10 ml de aire filtrado estéril el día 4. El día 6, se inició el tratamiento oral 1 hora antes de la inducción de la inflamación por inyección s.c. de una solución de LPS el día 6. Se inyectó un volumen de 5 ml de solución de LPS disuelto en una solución salina estéril (100 µg/kg) en cada bolsa. Se tomaron muestras de líquido de la bolsa a las 6 h después de la administración de LPS lavando la
15 bolsa con 5 ml de una solución salina estéril y extrayendo 4 ml de fluido. El número de leucocitos presentes en el fluido de la bolsa se determinó microscópicamente utilizando un hemocitómetro. El contenido de células diferenciales se determinó mediante examen microscópico de frotis de fluido teñidos con Diff-Quik.

El Compuesto A1 causó una reducción dependiente de la dosis de la migración de neutrófilos a la bolsa de aire de rata con un ED₅₀ de 2,65 mg/kg, lo que sugiere un papel terapéutico en la artritis reumatoide. Los resultados se
20 muestran en la Figura 2.

Ensayo 9: Eosinofilia pulmonar inducida por ovalbúmina en cobayas macho

Después del periodo de cuarentena, se recogen 0,3 ml de muestras de sangre de la vena orbital mediante el método
25 del plexo retroorbital de cada animal individual y se analizan en un analizador de células (ADVIA 2120, Siemens). Basándose en su recuento celular total, las cobayas se asignan al azar y se dividen en varios grupos. La oreja (pabellón) se marca con un rotulador indeleble para su identificación. El día 0, se registra el peso y los animales se sensibilizan con 50 µg de ovoalbúmina (OVA) y 10 mg de solución de alumbre (1 ml) por vía intraperitoneal. El día 7 y el día 14, se repite el protocolo de sensibilización anterior. Los animales se observan para detectar cualquier signo
30 de enfermedad o reacción a la sensibilización hasta el día 19 y se registran si los hay. Los días 19, 20 y 21, después del tratamiento con compuesto de ensayo por sonda oral, 30 minutos más tarde, los animales se exponen al 0,5% p/v, 0,5% y 1% de exposición a ovoalbúmina, respectivamente. Los animales del grupo control y simulado se tratan con 0,5% p/v de metilcelulosa (vehículo). Los grupos de control simulado se sensibilizan con 10 mg de alumbre los días 0, 7 y 14 y se exponen a una solución salina (SAL) con la misma tasa de nebulización el día 19, 20 y 21. Veinte
35 horas después de la última exposición a OVA, se mide la hiperreactividad de las vías respiratorias por pletismógrafo de cuerpo entero contra dosis acumuladas de estimulación con metacolina (75, 100, 125 y 150 µg/ml). Después de medir la respuesta de la vía aérea, se recogen muestras de sangre y líquido BAL. Las muestras se analizan para determinar el recuento total de células mediante el uso de una cámara nebular en el microscopio y el recuento diferencial de leucocitos se realiza manualmente.

40

Ensayo 10: Modelo de asma murino

Después del periodo de cuarentena, en función de su peso corporal, los ratones se asignaron al azar y se dividieron en cuatro grupos (n = 7). Las colas se marcaron con un rotulador indeleble para su identificación. El día 0, se registró
45 el peso y los animales se sensibilizaron con 100 µg de ovoalbúmina y 10 mg de solución de alumbre (0,2 ml) por vía intraperitoneal.

El día 7 y el día 14, se repitió el protocolo de sensibilización anterior. Los animales se observaron para detectar cualquier signo de enfermedad o reacción a la sensibilización hasta el día 24 y, de haberlos, se registraron. Los días
50 24, 25 y 26, después del tratamiento con compuesto de ensayo por sonda oral, 30 minutos más tarde, los animales se expusieron al 10 % p/v de exposición a ovoalbúmina.

Los animales del grupo control y simulado se trataron con 0,5% p/v de metilcelulosa (vehículo). Los grupos de control simulado se sensibilizaron con 10 mg de alumbre los días 0, 7 y 14 y se expusieron a una solución salina con
55 la misma tasa de nebulización los días 24, 25 y 26.

Cuarenta y ocho horas después de la última exposición a OVA, se midió la hiperreactividad de las vías respiratorias por pletismógrafo de cuerpo entero contra dosis acumuladas de estimulación con metacolina (2,5, 10, 50 y 100 mg/ml). Después de medir la respuesta de la vía aérea, se recogieron muestras de sangre y líquido BAL. Las

muestras se analizaron para determinar el recuento total de células mediante el uso de una cámara nebulosa en el microscopio y el recuento diferencial de leucocitos se realizó manualmente.

Ensayo 11: Artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas Wistar

- 5 Las ratas wistar hembras se aclimataron durante siete días antes del inicio del experimento y se distribuyeron al azar en varios grupos de acuerdo con su peso corporal. El día 0, los animales se trataron mediante inyección intradérmica de 500 µg de colágeno bovino tipo II emulsionado con adyuvante completo de Freund (IFA) que contenía MTB (4 mg/ml) administrado en la base de la cola. El día 7 después de la inmunización primaria, los animales se trataron mediante inyección de refuerzo de 300 µg de CII en adyuvante incompleto de Freund mediante inyección intradérmica en la base de la cola. El inicio de la artritis en las articulaciones del tobillo normalmente se hizo visible visualmente entre los días 12 y 14. Los animales se trataron con compuesto de ensayo o vehículo (administrado por vía oral) desde el día después del inicio de la artritis y el tratamiento continuó durante los siguientes 9 días consecutivos. Las puntuaciones de artritis se tomaron mediante un examen visual para detectar signos de inflamación articular regularmente durante el periodo de estudio. Las medidas de peso corporal, volumen de pata y espesor de pata se tomaron los días 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 10. Después del tratamiento de diez días, al final del estudio, se extrajo sangre en la autopsia y se procesó en suero o plasma y se tomaron todas las articulaciones, y tanto las patas delanteras como las traseras se fijaron en formalina al 10% para el análisis histopatológico después de extraer una pequeña porción de tejido de cada articulación y se almacenó a -80°C para el análisis de citocinas en homogeneizado tisular. Criterios de puntuación clínica para patas delanteras y traseras: 0 = normal; 1 = una articulación de pata trasera o delantera afectada o eritema difuso mínimo e hinchazón; 2 = dos articulaciones de pata trasera o delantera afectadas o eritema difuso leve e hinchazón; 3 = tres articulaciones de pata trasera o delantera afectadas o eritema difuso moderado e hinchazón; 4 = eritema difuso marcado e hinchazón, o = cuatro articulaciones afectadas; 5 = eritema difuso grave e hinchazón grave de toda la pata, sin poder doblar los dedos.
- 25 El compuesto A1 administrado terapéuticamente en el modelo de CIA de rata demuestra una eficacia significativa en la reducción de la puntuación clínica (Figuras 3A y 3B) observada tanto en las patas profilácticas (Figura 3C) como las patas terapéuticas (Figura 3D).
- 30 El Compuesto A1 dosificado terapéuticamente en el modelo CIA de rata demuestra una eficacia significativa en la reducción de los volúmenes promedio de pata de ambas patas traseras (Figuras 4A y 4B) y en el diámetro del tobillo (Figuras 4C y 4D).

35 Análisis histológico: El Compuesto A1 administrado terapéuticamente en el modelo CIA de rata demuestra una eficacia significativa en la inhibición de la inflamación (58,3%, véase la Figura 4A), cartílago (46,51%, véase la Figura 4B) y pannus (49,18%, véase la Figura 4C) observada por la histopatología de todas las patas traseras y delanteras.

40 La incidencia y la progresión de la artritis se redujeron significativamente en el grupo de tratamiento en comparación con los animales del grupo de control (Figura 5).

Ensayo 12: Infiltración de células inducida por humo de cigarrillo aguda en ratones Balb/c macho

- Los animales (ratones Balb/c macho) deben aclimatarse durante siete días antes del comienzo del experimento. Después, los animales se distribuirán aleatoriamente en varios grupos de acuerdo con su peso corporal. El día 1, a los ratones se les administrará el compuesto de ensayo o el vehículo por vía oral/intranasal y después de 1 hora, los animales del ensayo administrados con el compuesto de ensayo se colocarán en una caja de exposición de todo el cuerpo. El día 1 y el día 2, los ratones se exponen al humo común de 6 cigarrillos, de 8 cigarrillos el día 3 y de 10 cigarrillos el día 4. La exposición al humo de cada cigarrillo durará 10 minutos. Los cigarrillos se quemarán completamente en los primeros dos minutos, seguido de un flujo de aire con un ventilador para animales, y los próximos 20 minutos se expondrán a aire fresco. Después de cada segundo cigarrillo, se debe realizar una pausa adicional de 20 minutos con exposición al aire fresco de la sala. Los animales de control deben ser expuestos a la cámara de aire de la sala. Desde el día 1 hasta el día 4, a los animales se les administrará el compuesto de ensayo por vía oral o intranasal. El día 5, 24 horas después de la última exposición al humo de cigarrillo (CS), los animales se desangrarán bajo anestesia, se canulará la tráquea y se lavarán los pulmones con alícuotas de 0,5 ml de PBS heparinizado (1 unidad/ml) cuatro veces a través de una cánula traqueal (volumen total 2 ml). El fluido bronquioalveolar (BAL) recogido se almacenará a 2-8°C hasta que se analice el recuento total de células y leucocitos diferenciales. El fluido BAL se centrifugará (500 x g durante 10 min) y el sedimento celular resultante se resuspende en 0,5 ml de solución salina heparinizada. El número total de glóbulos blancos se determinará en el fluido BAL y la sangre utilizando un contador de células sanguíneas y se ajustará a 1×10^6 células/ml. El recuento de

células diferenciales se calcula manualmente. Cuarenta microlitros de la suspensión celular se centrifugan utilizando Cytospin 3 para preparar un frotis celular. El frotis celular se tiñe con una solución de tinción de sangre para la diferenciación y se observa microscópicamente para identificar eosinófilos de acuerdo con sus características morfológicas. El número de cada tipo de célula entre 300 glóbulos blancos en el frotis celular se determinará y se expresará como un porcentaje, y se calculará el número de neutrófilos y macrófagos en cada fluido BAL.

Ensayo 13: Psoriasis en placas inducida por imiquimod en modelos de ratones Balb/c

El imiquimod (IMQ) es un ligando para TLR7 y TLR8, originalmente utilizado para el tratamiento de cánceres de piel no melanoma. La aplicación tópica de IMQ en la piel afeitada del ratón induce una afección cutánea parecida a la psoriasis, que muestra la mayoría de los rasgos característicos de la patología de la psoriasis humana, incluyendo acantosis, paraqueratosis e infiltración de células inmunitarias, y la participación de la ruta IL23/IL17/IL22. Los animales (ratones Balb/c macho) se aclimataron durante siete días antes del comienzo del experimento. Los animales se distribuyeron al azar en varios grupos de acuerdo con su peso corporal. El día 0, se afeitó la piel de la espalda de los ratones mediante la aplicación tópica de crema de eliminación del vello. El día 1, a los ratones se les administró el compuesto de ensayo o el vehículo por vía oral y después de 1 hora, los ratones que recibieron el compuesto de ensayo recibieron una aplicación tópica de 62,5 mg de crema IMQ disponible comercialmente (5%; Beselna Cream; Mochida Pharmaceuticals, Tokio, Japón) sobre la piel afeitada. Los ratones se trataron con aplicación tópica de imiquimod durante los siguientes 5 días consecutivos, una hora después de la administración del compuesto de ensayo o del vehículo. Los animales se dejaron secar durante una hora antes de devolverlos a sus jaulas después de la aplicación tópica todos los días. Cuatro horas después de la aplicación final de la crema IMQ, se sacrificaron los ratones y se obtuvieron muestras de piel. El espesor de la piel de la espalda se midió utilizando un medidor de espesor de esfera. Después de medir el espesor de la piel, las muestras de piel se fijaron en una solución de formalina tamponada neutra al 10% y se incluyeron en parafina. Las secciones desparafinadas se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). El espesor epidérmico se cuantificó promediando los valores de cinco campos independientes por sección. Para evaluar la gravedad de la inflamación de la piel de la espalda, se utilizó un sistema de puntuación objetivo basado en el Área de psoriasis clínica humana y el Índice de gravedad (PASI). Eritema, descamación y engrosamiento se puntuaron de forma independiente en una escala de 0 a 4: 0 = ninguno; 1 = ligero; 2 = moderado; 3 = marcado; y 4 = muy marcado.

Como se muestra en las Figuras 6A y 6B, el Compuesto A1 redujo el espesor de la piel, el eritema y la descamación (como se muestra en la puntuación histopatológica) en comparación con los animales del grupo de control.

Las reivindicaciones adjuntas definen el alcance de la invención y el de los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. El compuesto se selecciona de:
- 5 (RS)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida;
 (S)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida;
 10 (R)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida;
- y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
2. Un compuesto de la reivindicación 1 seleccionado de (S)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil) metanosulfonamida y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el compuesto está sustancialmente libre de (R)-N-(5-(4-amino-1-(1-(5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-oxo-4H-cromen-2-il)etil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-3-il)-2-metoxifenil)metanosulfonamida y una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. El compuesto de la reivindicación 2 o 3, en el que el compuesto tiene un exceso enantiomérico de más de aproximadamente el 95%.
- 25 5. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección, que se beneficiará de la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 δ/γ cinasa.
- 30 7. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con PI3K.
- 35 8. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, comprendiendo el uso además administrar un agente activo adicional seleccionado de agentes anticancerosos, agentes antiinflamatorios, agentes inmunosupresores, esteroides, agentes antiinflamatorios no esteroideos, antihistamínicos, analgésicos, y mezclas de los mismos.
- 40 9. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad, trastorno o afección que se beneficiará de la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 δ/γ cinasa se selecciona de enfermedades proliferativas, un trastorno óseo, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad inmune, una enfermedad del sistema nervioso, una enfermedad metabólica, una enfermedad respiratoria, trombosis y enfermedad cardíaca.
- 45 10. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad, trastorno o afección que se beneficiará de la inhibición de la actividad catalítica de una PI3 δ/γ cinasa se selecciona de carcinoma de vejiga, mama, colon, riñón, hígado, pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, esófago, vesícula biliar, ovario, páncreas, estómago, cuello del útero, tiroides, próstata y piel, incluyendo carcinoma de células escamosas; leucemia, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, linfoma de Hodgkin (LH), linfoma no Hodgkin (LNH), linfoma de células pilosas y linfoma de Burkett; leucemias mielógenas agudas y crónicas, leucemia mieloide aguda (AML), mieloma múltiple (MM), linfoma linfocítico pequeño (SLL) o linfoma no hodgkiniano indolente (I-NHL), síndrome mielodisplásico y leucemia promielocítica; fibrosarcoma y rabdomiosarcoma; astrocitoma, neuroblastoma, glioma y schwannomas; melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderoma pigmentoso, queratocantoma, cáncer folicular de tiroides y sarcoma de Kaposi en un paciente que lo necesite.
- 50 11. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la enfermedad, trastorno o afección asociada con PI3K es una enfermedad relacionada con el sistema inmune, una enfermedad o

trastorno que implica inflamación, cáncer u otra enfermedad proliferativa, una enfermedad o trastorno hepático, o una enfermedad o trastorno renal.

12. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfoblástica aguda, linfoma de linfocitos 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 o leucemia promielocítica en un paciente que lo necesite.

10 13. El compuesto o composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, glomerulonefritis, enfermedades neuroinflamatorias, esclerosis múltiple, uveítis, psoriasis, lupus, osteoartritis, rinitis alérgica, lupus o encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), lupus eritematoso y trastornos del sistema inmunitario.

15

14. Un compuesto seleccionado de

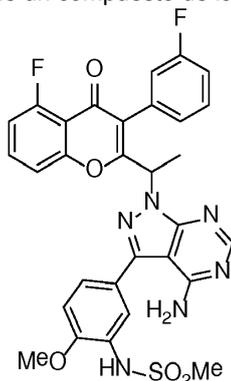
(S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona,

20

(S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona,

y sales de los mismos.

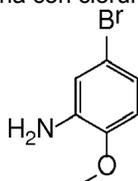
25 15. Un proceso para la preparación de un compuesto de la reivindicación 1 de fórmula (I)



(I)

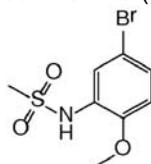
que comprende las etapas de:

(a) hacer reaccionar 5-bromo-2-metoxianilina con cloruro de metanosulfonilo



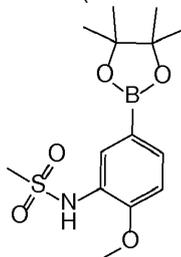
30

para dar N-(5-bromo-2-metoxifenil)metanosulfonamida (Intermedio 1)



Intermedio 1;

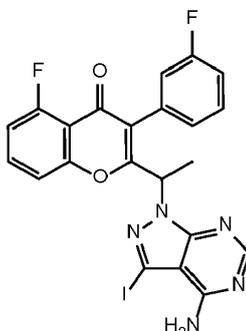
(b) hacer reaccionar el Intermedio 1 con bis(pinacolato)diboro para dar N-(2-metoxi-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)fenil)metanosulfonamida (Intermedio 2)



Intermedio 2;

5

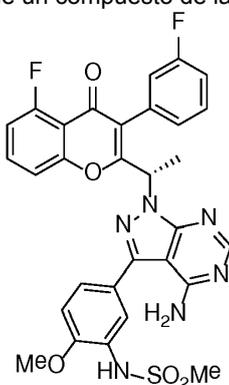
(c) hacer reaccionar 2-(1-(4-amino-3-yodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona



con el intermedio 2 en presencia de una base adecuada para dar un compuesto de fórmula (I).

10

16. Un proceso para la preparación de un compuesto de la reivindicación 1 de fórmula (A1)

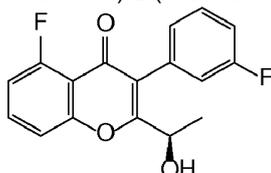


(A1)

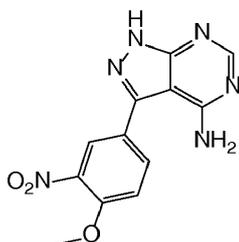
que comprende las etapas de:

15

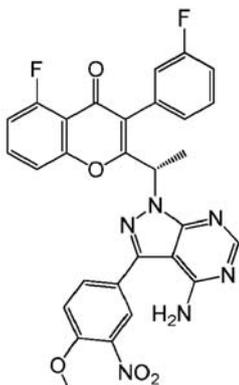
(a) hacer reaccionar (R)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-hidroxietil)-4H-cromen-4-ona



con 3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-amina



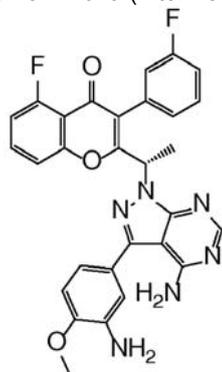
en condiciones de Mitsunobu usando trifenilfosfina y azodicarboxilato de diisopropilo para dar (S)-2-(1-(4-amino-3-(4-metoxi-3-nitrofenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (Intermedio 3)



Intermedio 3;

5

(b) reducir el intermedio 3 para dar (S)-2-(1-(4-amino-3-(3-amino-4-metoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-ona (Intermedio 4)



Intermedio 4;

10

(c) hacer reaccionar el Intermedio 4 con cloruro de metanosulfonilo para dar un compuesto de la fórmula (A1).

Figura 1

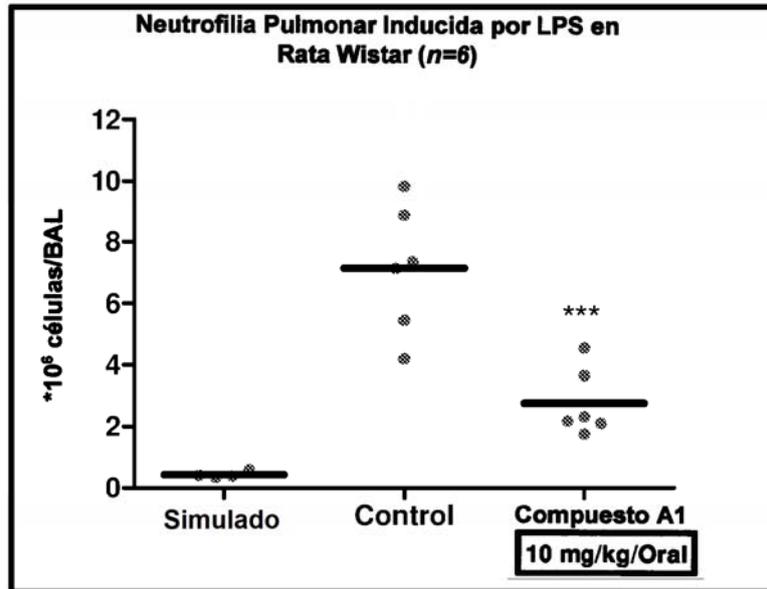


Figura 2

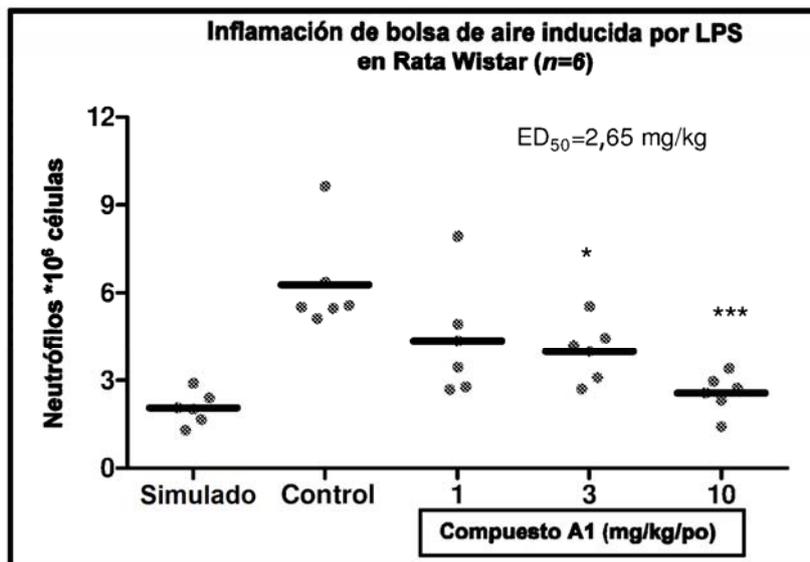


Figura 3A

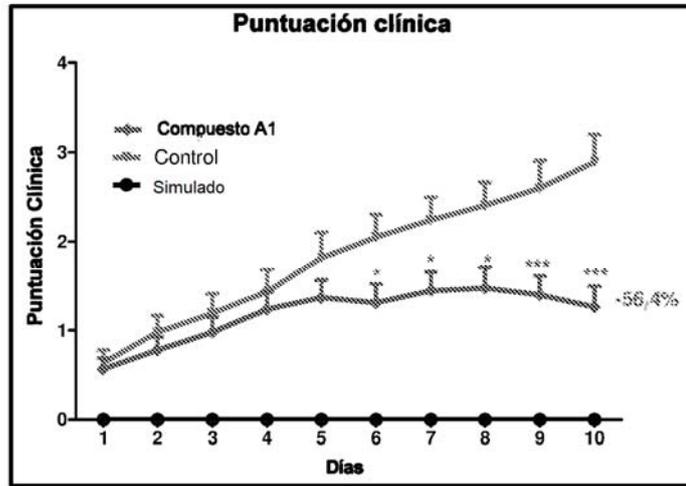


Figura 3B

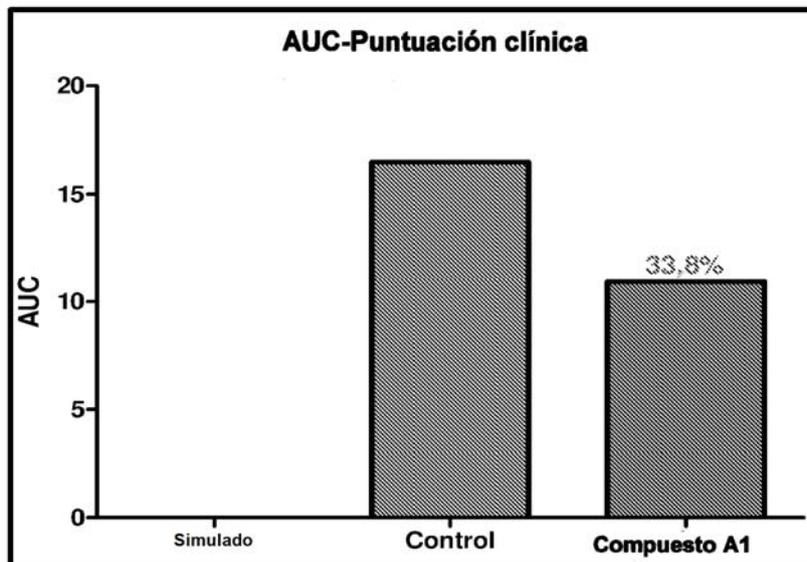


Figura 3C

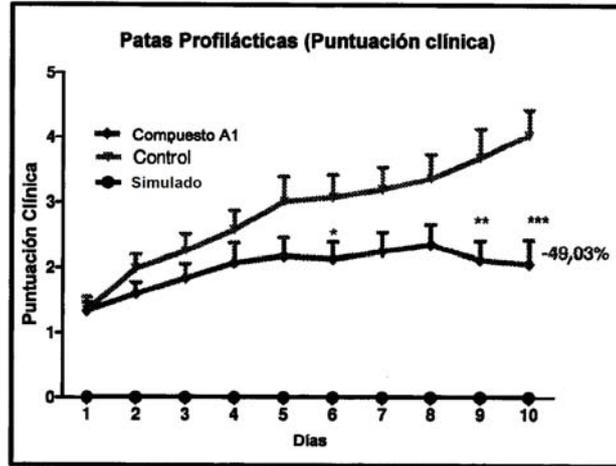


Figura 3D

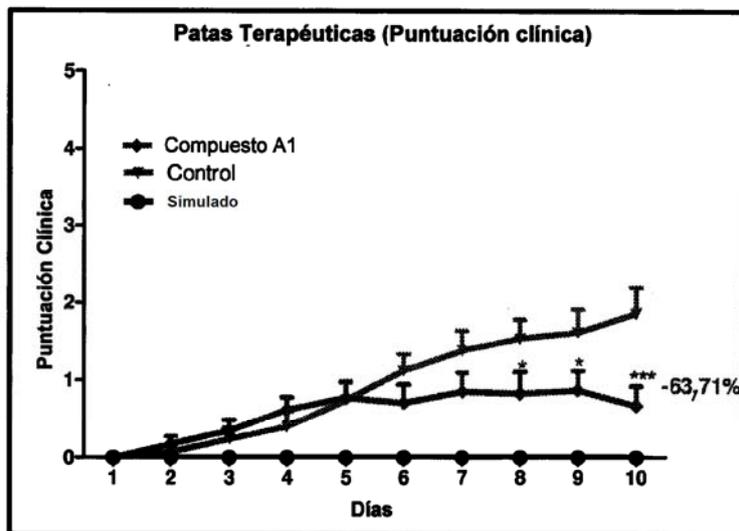


Figura 4A

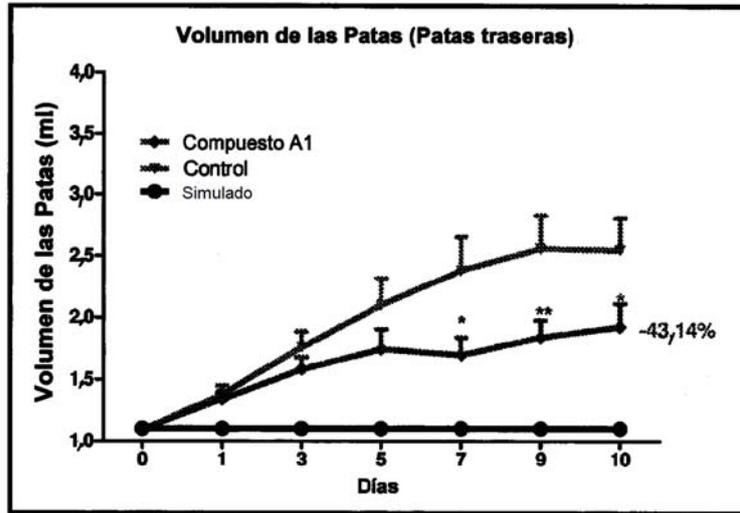


Figura 4B

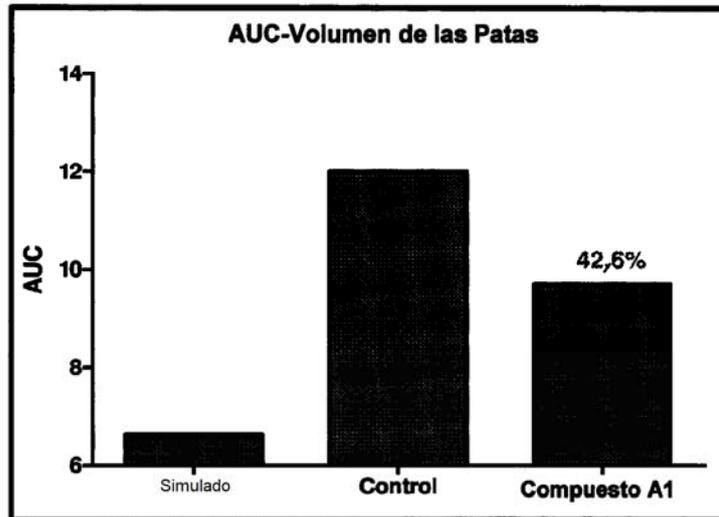


Figura 4C

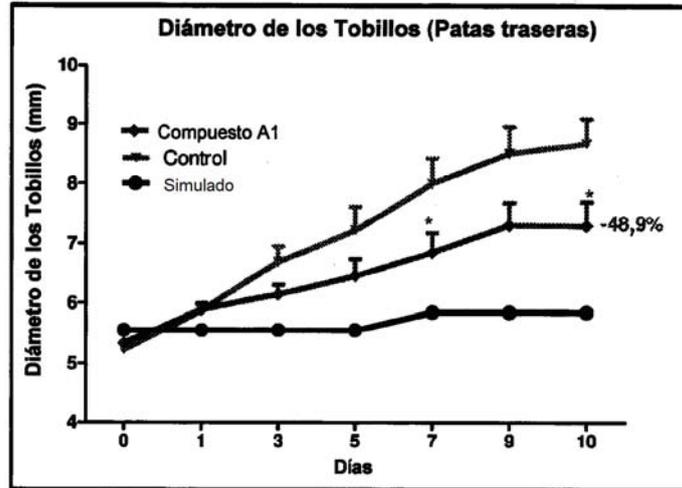


Figura 4D

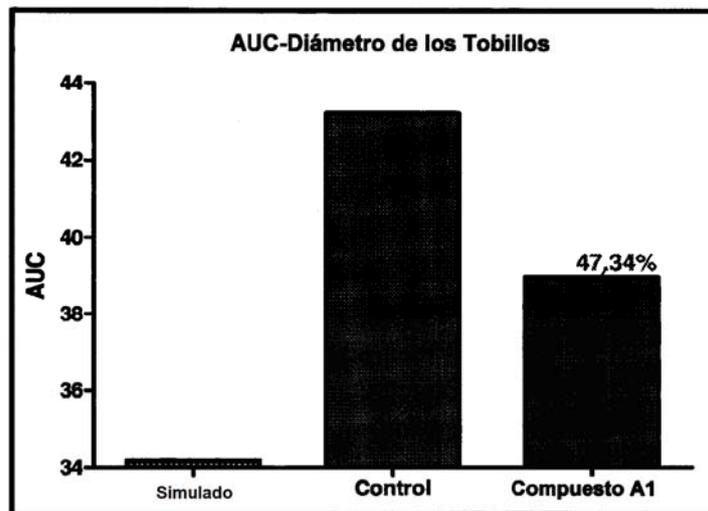


Figura 4E

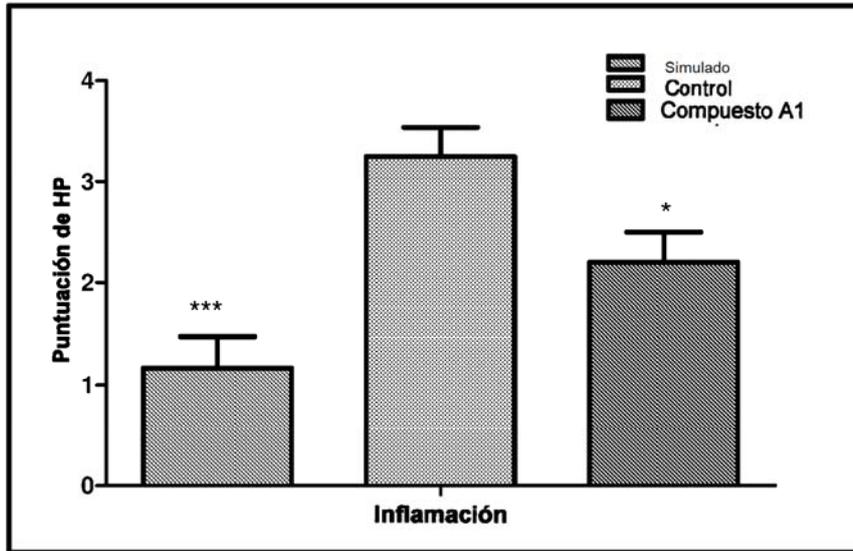


Figura 4F

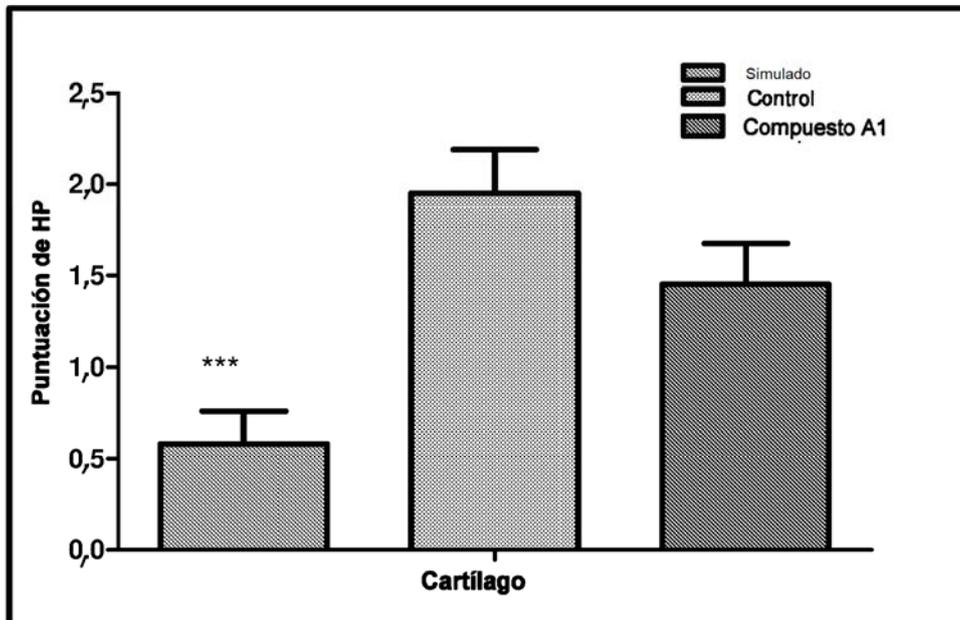


Figura 4G

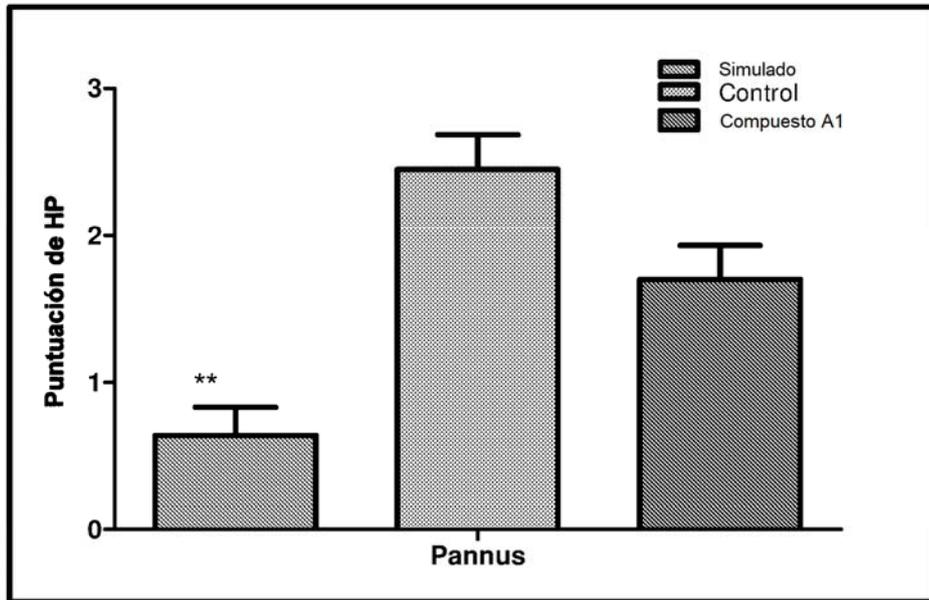


Figura 4H

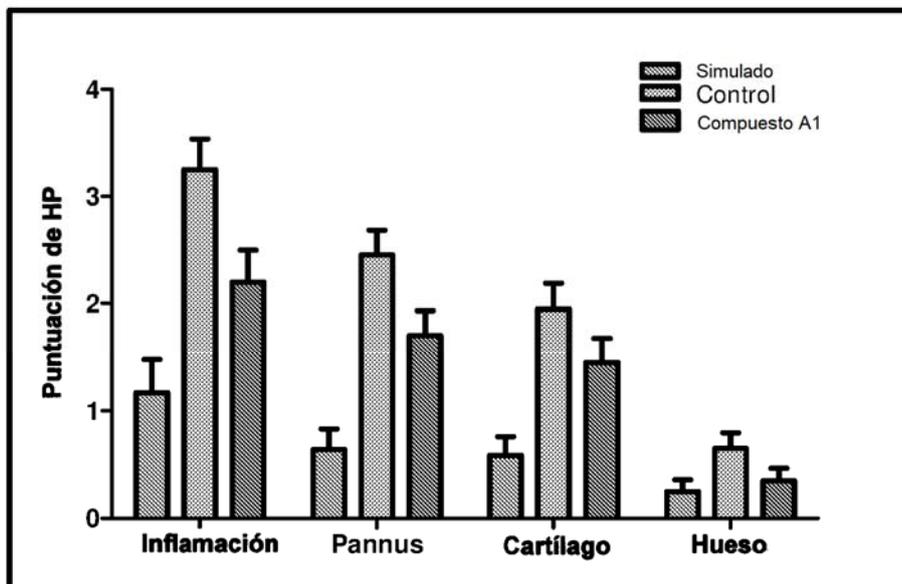


Figura 5

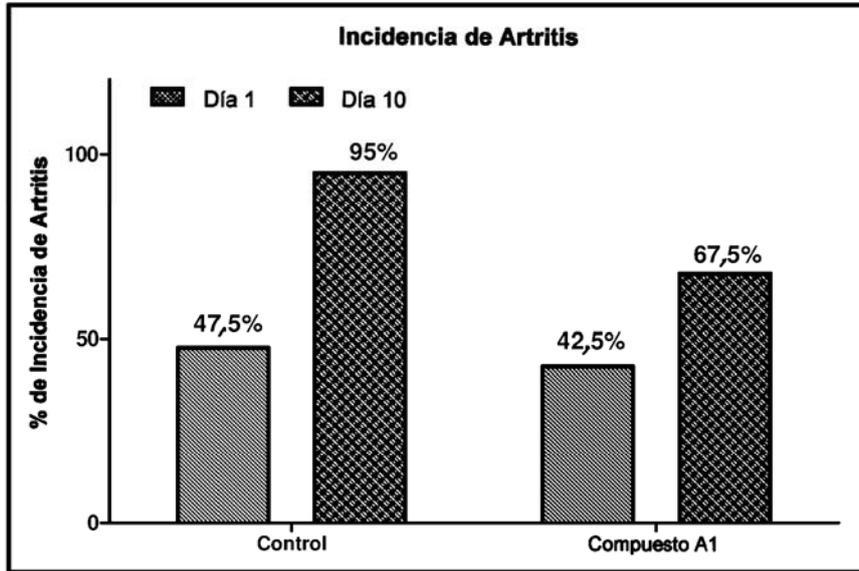


Figura 6A

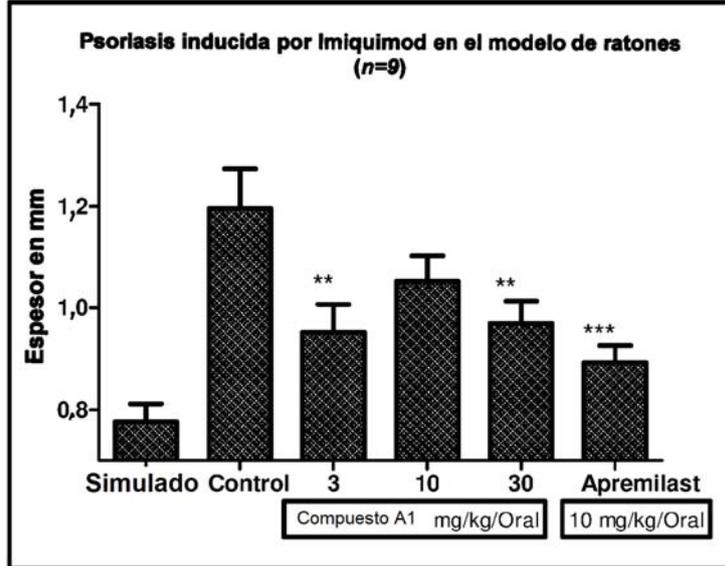


Figura 6B

