

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 687 593**

(51) Int. Cl.:

C07D 471/04 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2014 PCT/US2014/057499**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015 WO15048318**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2014 E 14789651 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3049415**

(54) Título: **Un inhibidor selectivo de fosfatidilinositol 3-quinasa-gamma**

(30) Prioridad:

25.09.2013 US 201361882473 P

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

26.10.2018

(73) Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
50 Northern Avenue
Boston, MA 02210, US**

(72) Inventor/es:

**BOYD, MICHAEL JOHN;
ARONOV, ALEX;
O'DOWD, HARDWIN y
GREEN, JEREMY**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 687 593 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

Un inhibidor selectivo de fosfatidilinositol 3-quinasa-gamma

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un compuesto útil como un inhibidor de la isoforma gamma de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K γ). La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden el compuesto de la invención y métodos de uso del compuesto y composiciones en el tratamiento de diversos trastornos.

Antecedentes

Las PI3K son una familia de quinasas lipídicas que catalizan la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) lípido de membrana en la posición 3'-OH del grupo inositol para producir PI 3-fosfato [PI(3)P, PIP], PI 3,4-bisfosfato [PI(3,4)P₂, PIP2] y PI 3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P₃, PIP3]. PI(3,4)P₂ y que PI(3,4,5)P₃ actúan como sitios de reclutamiento para diversas proteínas de señalización intracelular, que a su vez forman complejos de señalización para transmitir señales extracelulares a la cara citoplasmática de la membrana plasmática.

Hasta el momento se han identificado ocho PI3K de mamífero, incluyendo cuatro PI3K de clase I. La clase I incluye PI3K α , PI3K β y PI3K δ . Todas las enzimas de clase I son complejos heterodiméricos que comprenden una subunidad catalítica (p110 α , p110 β o p110 δ) asociada a una subunidad de adaptador p85 que contiene dominio SH2. Las de PI3K clase I se activan a través de señalización de tirosina quinasa y están implicadas en proliferación y supervivencia celular. PI3K α y PI3K β también se han implicado en la tumorigénesis en una diversidad de cánceres humanos. Por lo tanto, los inhibidores farmacológicos de PI3K α y PI3K β son útiles para tratar diversos tipos de cáncer.

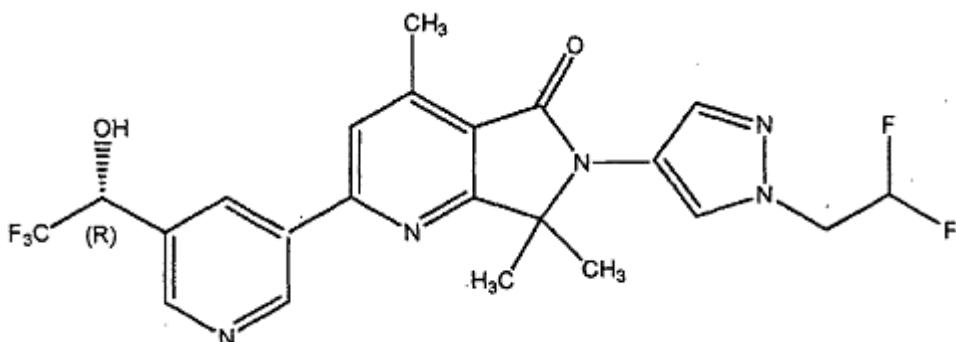
PI3K γ , el único miembro de las PI3K de Clase Ib, consiste en una subunidad catalítica p110 γ , que está asociada a una subunidad reguladora p101. PI3K γ está regulado por receptores acoplados a proteína G (GPCR) mediante asociación con subunidades $\beta\gamma$ de proteínas G heterotriméricas. PI3K γ se expresa principalmente en células hematopoyéticas y cardiomiositos y está implicado en inflamación y función de los mastocitos. Por lo tanto, los inhibidores farmacológicos de PI3K γ son útiles para tratar una diversidad de enfermedades inflamatorias, alergias y enfermedades cardiovasculares.

Aunque se ha desarrollado un número de inhibidores de PI3K-gamma, existe la necesidad de compuestos adicionales para inhibir PI3K-gamma para el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades. Son particularmente deseables los inhibidores de PI3K-gamma con una mejora del comportamiento farmacocinético/farmacodinámico *in vivo*, tal como, por ejemplo, los inhibidores que aumentan la exposición del fármaco al tejido diana a la vez que minimizan los efectos no diana. Una exposición por dosis unitaria más elevada disminuye la exposición fuera de diana con respecto a la exposición en el tejido diana. A menudo las toxicidades limitantes de la dosis se producen en órganos implicados en la eliminación del fármaco de la circulación o en el caso de un agente administrado por vía oral, en el tracto gastrointestinal (GI). Una disminución de la eliminación y la mejora de la biodisponibilidad aumentan la C_{máx} en el plasma a la vez que limita la C_{máx} en los órganos de eliminación tales como riñón, hígado, y GI. Además, el aumento de la absorción y la disminución de la eliminación (aumento de la biodisponibilidad) con frecuencia da como resultado menos variabilidad entre pacientes en términos de exposición, aumentando de ese modo el perfil de seguridad del agente administrado. Además, también son deseables agentes que demuestren una mejora de las propias físicas, tales como, por ejemplo, solubilidad acuosa más elevada.

50 Sumario

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

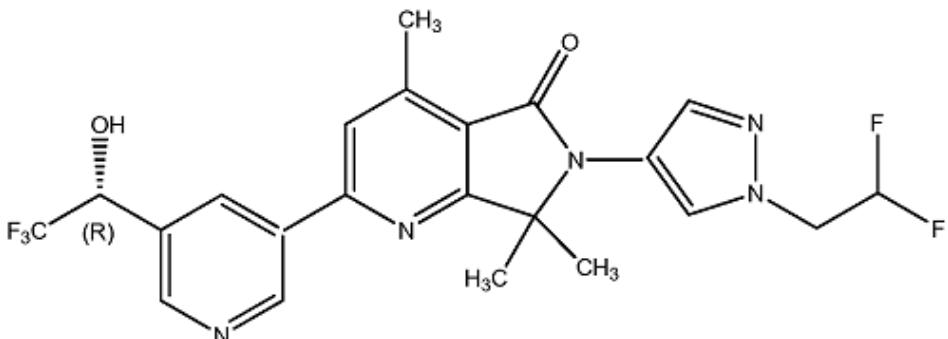
La presente invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, la invención se refiere a dicho compuesto o al del mismo, o una composición farmacéutica del mismo para uso en el tratamiento o la disminución de la gravedad de

- 5 una enfermedad o afección seleccionada entre una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria
seleccionada entre asma, dermatitis atópica, rinitis, enfermedades alérgicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), shock séptico, fibrosis pulmonar idiopática, apoplejía, quemaduras, enfermedades de las articulaciones, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, aterosclerosis, pancreatitis aguda, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, y enfermedad de Graves. Además, la
10 invención se refiere a un método para inhibir la actividad de PI3K-quinasa gamma en una muestra biológica que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con dicho compuesto, o una composición que comprende dicho compuesto. Además, la invención se refiere a un método para inhibir de forma selectiva una isoforma de PI3K-gamma con respecto al menos a otra isoforma de PI3K que comprende poner en contacto una muestra biológica con dicho compuesto o una composición que comprende dicho compuesto.

- 15 Se ha encontrado que el compuesto de la presente invención, (R)-6-(1-(2,2-difluoroethyl)-1H-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-2-(5-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)piridin3-il)-6,7-dihidro-5H-pirrolo[3,4-b]piridin-5-ona, y composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo, es un inhibidor de PI3Kγ eficaz y selectivo, con una mejora del perfil farmacocinético/farmacodinámico cuando se compara con otros inhibidores de PI3Kγ. Por consiguiente, la invención
20 presenta un compuesto que tiene la siguiente estructura:



(Compuesto 1)

- 25 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen el compuesto 1 y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estos compuestos y composiciones farmacéuticas son útiles para tratar o disminuir la gravedad de una diversidad de trastornos, incluyendo trastornos inflamatorios e inmunorreguladores, tales como asma, dermatitis atópica, rinitis, enfermedades alérgicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), shock séptico, fibrosis pulmonar idiopática, apoplejía, quemaduras, enfermedades de las articulaciones, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, aterosclerosis, pancreatitis aguda, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, y enfermedad de Graves.

30 El compuesto y composiciones proporcionados por la presente invención también son útiles para el estudio de PI3K en fenómenos biológicos y patológicos; el estudio de rutas de transducción de señales intracelulares mediadas por las quinasas de ese tipo; y la evaluación comparativa de nuevos inhibidores de quinasa.

- 35 La Figura 1 muestra los resultados para el Compuesto 1 sometido a ensayo en el modelo terapéutico de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratón a 2,5 mg/kg BID, 5 mg/kg BID, y 10 mg/kg BID (20 mg/kg/día).

- 40 La Figura 2 muestra los resultados para el Compuesto 1 sometido a ensayo en el modelo de CIA a 2,5 mg/kg BID, 5 mg/kg BID, y 10 mg/kg BID (20 mg/kg/día). Los resultados se muestran solamente para las patas que muestran

signos clínicos de artritis en el momento del reclutamiento.

La Figura 3 muestra los resultados para el Compuesto 1 sometido a ensayo en el modelo de CIA a 2,5 mg/kg BID, 5 mg/kg BID, y 10 mg/kg BID (20 mg/kg/día). Los resultados se muestran solamente para las patas que no muestran signos clínicos de artritis en el momento del reclutamiento.

La Figura 4 muestra los resultados para el Compuesto 1 sometido a ensayo en el modelo de IBD a 5 mg/kg BID y 10 mg/kg BID.

10 Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se indique de otro modo. Para fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, y el Handbook of Chemistry and Physics, 75^a Ed. 1994. Además, los principios generales de la química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y en "March's Advanced Organic Chemistry", 5^a Ed., Smith, MB. y March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001.

Los compuestos que se han dibujado con centros estereoquímicos definidos son estereoquímicamente puros, pero con la estereoquímica absoluta todavía sin definir. Los compuestos de ese tipo pueden cualquiera de las configuraciones R o S. En esos casos en los que se ha determinado una asignación absoluta, el centro o centros quirales se marcarán como R o S en la figura. Aunque el Compuesto 1 en el presente documento se dibuja en la configuración R, la presente invención incluye realizaciones en la configuración S y en mezclas racémicas de las configuraciones R y S.

La invención también presenta una composición farmacéutica que comprende cualquier compuesto de la invención y un excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización, la divulgación presenta un método para inhibir la actividad de PI3K quinasa en un paciente mediante la administración al paciente del Compuesto 1, o una composición farmacéutica del mismo. En una realización adicional, PI3K-gamma se inhibe de forma selectiva con respecto a PI3K-alfa, PI3K-beta, o PI3K-delta.

En otra realización, la divulgación presenta un método para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada entre trastornos inflamatorios e inmunorreguladores, tales como asma, dermatitis atópica, rinitis, enfermedades alérgicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), shock séptico, fibrosis pulmonar idiopática, apoplejía, quemaduras, enfermedades de las articulaciones, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, aterosclerosis, pancreatitis aguda, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohns, y enfermedad de Graves en un paciente mediante la administración al paciente del Compuesto 1, o una composición farmacéutica del mismo.

La invención también presenta un método no terapéutico para inhibir la actividad de quinasa PI3K-gamma en una muestra biológica *in vitro* que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con el Compuesto 1, o una composición que contiene dicho compuesto.

45 Composiciones, Formulaciones, y Administración de Compuestos de la Invención

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1. Por ejemplo, la invención proporciona una composición que comprende el Compuesto 1 o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la cantidad de compuesto en una composición de la presente invención es tal que es eficaz para inhibir de forma mensurable a PI3Kγ en una muestra biológica o en un paciente. En una realización, la composición de la presente invención se formula para administración a un paciente con necesidad de una composición de ese tipo. En una realización adicional, la composición de la presente invención se formula para administración oral a un paciente. El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano.

También se observará que ciertos compuestos de la presente invención pueden existir en forma libre para tratamiento, o cuando sea apropiado, como un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con la presente invención, un derivado farmacéuticamente aceptable incluye, pero no se limita, sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, sales de tales ésteres, o cualquier otro aducto o derivado que después de su administración a un paciente con necesidad es capaz de proporcionar, directa o indirectamente, el compuesto como se describe en el presente documento de otro modo, o un metabólico resto del mismo. Como se usa en el presente documento, la expresión término "metabólico activo inhibitorio o resto del mismo" se refiere a que un metabólico o resto del mismo también es un inhibidor de PI3K-gamma.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que, dentro del alcance del criterio médico sensato, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, y similares.

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge *et al.*, describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en *J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19, 1977, que se incorpora en el presente documento como referencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención incluyen las obtenidas a partir de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos adecuados. Los ejemplos desales de adición de ácido no tóxicas, farmacéuticamente aceptables son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o mediante el uso de otros métodos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales obtenidas a partir de bases apropiadas incluyen sales de metal alcalino, metal alcalinotérreo, amonio y N⁺(alquilo C₁₋₄)₄. La presente invención también concibe la cuaternización de cualquier grupo que contenga nitrógeno básico de los compuestos que se desvelan en el presente documento. Con una cuaternización de ese tipo se pueden obtener productos solubles en agua o en aceite o dispersables. Las sales representativas de metal alcalino o alcalinotérreo incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, cationes de amino formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato C₁₋₈ y sulfonato de arilo.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención comprenden adicionalmente un excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable, que, como se usa en el presente documento, incluyen todos y cada uno de disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, adyuvantes de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma de dosificación en particular deseada. En Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21^a edición, 2005, ed. D.B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, y *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York, cuyos contenidos se incorporan como referencia en el presente documento, se desvelan diversos vehículos usados para formular composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida en la que cualquier medio de vehículo convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tales como mediante la producción de cualquier efecto biológico no deseado o interacción de otro modo de una manera perjudicial con cualquier otro componente(s) de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su uso está dentro del alcance de la presente invención.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sóblico, o sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, lanolina, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetil celulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de coco y ceras para suppositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol étílico, y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como lauril sulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también puede estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio del formulador.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante pulverización por nebulización, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal, por vía bucal, por vía vaginal o mediante un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intraocular, intrahepático, intralesional, epidural, intraespinal, e intracraneal o técnicas de infusión. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa. Las formas inyectables

- estériles de las composiciones de la presente invención pueden ser suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes de dispersión o ubicación adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro sódico. Además, como un medio disolvente o de suspensión se usan convencionalmente aceites no volátiles, estériles.
- Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil blando incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Los ácidos gramos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos son útiles en la preparación de inyectables, al igual que lo son los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxetiladas. Estas soluciones o suspensiones onerosas también pueden contener un agente diluyente o de dispersión de alcohol de cadena larga, tal como carboximetil celulosa o agentes de dispersión similares que se usan normalmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usa normalmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas, u otras formas de clasificación también se pueden usar con fines de formulación.
- Las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los vehículos usados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Por lo general también se añaden agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requiere suspensiones a cursos para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.
- Como alternativa, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden administrar en forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fungirá en el recto para liberar el fármaco. Los materiales de este tipo incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicos.
- Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquida pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilen glicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino, y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicos y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, y perfumantes.
- Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están agua, solución de Ringer, solución de cloruro sódico U.S.P. e isotónica. Además, de forma convencional se usan aceites no volátiles estériles como un medio disolvente o de suspensión. Para este fin se puede usar cualquier aceite volátil blando incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se usarán ácidos grasos tales como ácido oleico.
- Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.
- Con el fin de prolongar el efecto del compuesto de la presente invención, a menudo es deseable de disminuir la absorción del compuesto a partir de inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir mediante el uso de una suspensión liquidada de material cristalino o amorfio con una escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del compuesto entonces depende de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la disolución o la suspensión del compuesto en un vehículo oleoso consigue un retraso de la absorción de una forma de compuesto administrado por vía parenteral. Las formas de deposición inyectable se preparan formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros

- biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de compuesto con respecto a polímero y de la naturaleza del polímero usado en particular, la tasa de liberación de compuesto se puede controlar. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y polí(anhídridos). Las formulaciones inyectables de deposición también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales. Los compuestos de la presente invención se pueden incorporar en otras formulaciones de liberación sostenida convencionales para proporcionar una liberación controlada de los mismos durante un periodo de tiempo deseado, desde horas a días a meses.
- 5 Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferentemente supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos de la presente invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para suppositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto se funden en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.
- 10 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En las formas de dosificación sólida de ese tipo, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, inerte tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o agentes de expansión tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, a) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa, y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes dispersantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la solución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato sódico, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes de tamponamiento.
- 15
- 20
- 25
- Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden usar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes de opacidad y también pueden ser de una composición que libere el principio o principios activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden usar como cargas en cápsulas de gelatina cargadas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- Los compuestos activos también pueden estar en forma micro-encapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras, y gránulos se pueden preparar con revestimientos y cubiertas tales como revestimientos entéricos, revestimientos que controlan la liberación y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En las formas de dosificación sólidas de este tipo el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Las formas de dosificación de ese tipo también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas a los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de formación de comprimidos y otros adyuvantes de formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Pueden contener opcionalmente agentes de opacidad y también pueden ser de una composición que libere el principio o principios activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.
- 55
- 60
- Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica del compuesto de la presente invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, agentes de inhalación o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o tampón necesario si así se requiriera. También se contempla que las formulaciones oftálmicas, gotas para oídos y gotas oculares están dentro del alcance de la presente invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un compuesto al organismo. Las formas de clasificación de este tipo se pueden preparar por disolución o distribución del compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La tasa se puede controlar proporcionando una membrana que controla la tasa o mediante dispersión del compuesto en una matriz polimérica o gel.
- 65
- Los compuestos de la invención se formulan preferentemente en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma unitaria de dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente separada de agente apropiada para el paciente que se va a tratar. Sin embargo, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente

invención los decidirá el médico que prescribe dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente urbanismo en particular dependerá de una diversidad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico usado; la composición específica usada; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y tasa de excreción del compuesto específico usado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico usado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

- 5 La cantidad de los compuestos de la presente invención que se pueden combinar con los materiales vehículo para producir una composición en una forma de dosificación individual variarán dependiendo de huésped tratado, el modo de administración en particular. Preferentemente, las composiciones deberían formular de modo que una dosificación entre 0,01 - 100 mg/kg, tal como 0,1 - 100 mg/kg y 0,1 - 10 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor se puede administrar a un paciente que recibe estas composiciones.
- 10 Dependiendo de la afección, o enfermedad en particular, que se va a tratar o prevenir, en las composiciones de la presente invención también pueden estar presentes agentes terapéuticos adicionales, que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección. Como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que normalmente se administran para tratar o prevenir una enfermedad en particular, o afección, se conocen como "apropiados para la enfermedad, o afección, que se está tratando". A continuación se proporcionan ejemplos de agentes terapéuticos adicionales.
- 15
- 20

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de la presente invención no será superior a la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único agente activo. Preferentemente la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones que se desvelan en la actualidad variará de aproximadamente un 50 % a un 100 % de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende a ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

Usos de los Compuestos y Composiciones de la Invención

- 30 En un aspecto de la divulgación, la divulgación presenta un método para tratar o disminuir la gravedad de una afección o enfermedad mediada por PI3K-gamma. La expresión "enfermedad mediada por PI3K-gamma", como se usa en el presente documento se refiere a cualquier enfermedad u otra afección perjudicial en la que se sabe que la isoforma PI3K-gamma desempeña un papel.
- 35 Por consiguiente, en una realización adicional, el compuesto de la invención es selectivo para la inhibición de la isoforma PI3K γ . En una realización, un compuesto o composición de la invención es selectivo para la inhibición de la isoforma PI3K gamma con respecto a la isoforma PI3K alfa en un ensayo *in vitro* al menos en 20 veces. En otra realización, el compuesto selectivo de PI3K γ de la invención presenta la isoforma gamma con respecto a las isoformas alfa, beta, y delta en un ensayo *in vitro* al menos en 20 veces. La presente invención incluye adicionalmente el uso de la selectividad de los compuestos y composiciones de la presente invención *in vivo* para tratar pacientes con necesidad de una terapia de ese tipo.
- 40

45 El compuesto o composiciones de la invención se pueden administrar con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en los que el agente terapéutico adicional es apropiado para la enfermedad que se está tratando junto con el compuesto o composición de la invención como una forma de dosificación individual o por separado del compuesto o composición como parte de una forma de dosificación múltiple. El agente terapéutico adicional se puede administrar al mismo tiempo que el compuesto de la invención o en un momento diferente. En el último caso, la administración se escalonará por ejemplo en, 6 horas, 12 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes o 2 meses.

- 50 La invención proporciona un método para inhibir la actividad de quinasa PI3K-gamma en una muestra biológica que incluye poner en contacto la muestra biológica con el compuesto o composición de la invención. La expresión "muestra biológica", como se usa en el presente documento, se refiere una muestra fuera de un organismo vivo e incluye, pero no se limita a, cultivos celulares extractos de los mismos; material biopsiado obtenido a partir de un mamífero o extractos del mismo; y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas, u otros fluidos corporales o extractos de los mismos. La inhibición de la actividad de quinasa, en particular la actividad de quinasa PI3K-gamma, en una muestra biológica es útil para una diversidad de fines conocidos por alguien con experiencia en la materia. Los ejemplos de los fines de ese tipo incluyen, pero no se limitan a, almacenamiento de la muestra de ensayo biológico y ensayos biológicos. En una realización, el método para inhibir la actividad de quinasa PI3K-gamma en una muestra biológica se limita a métodos no terapéuticos.
- 55
- 60

Preparación del Compuesto de la Invención

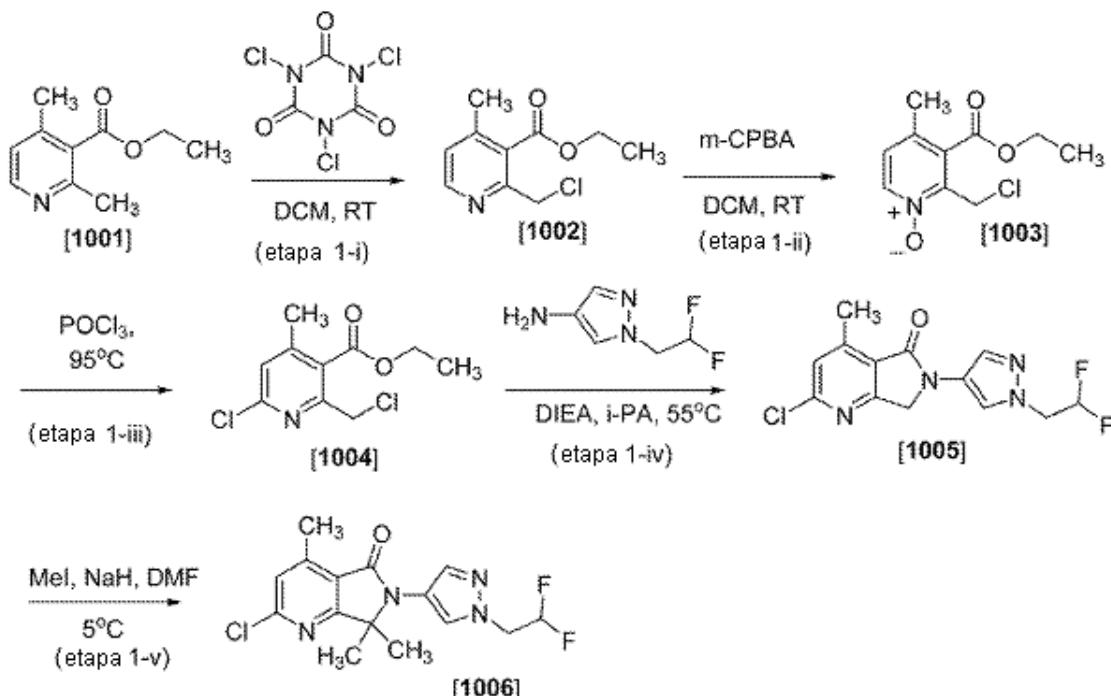
- 65 Como se usa en el presente documento, todas las abreviaturas, símbolos y convenciones son coherentes con las usadas en la bibliografía científica contemporánea. Véase, por ejemplo, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2^a Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997. las siguientes

definiciones describen términos y abreviaturas usados en el presente documento:

	ATP	trifosfato de adenosina
	Solución salina saturada	una solución de NaCl saturada en agua
5	CRED	carbonil reductasa
	DCM	diclorometano
	DIEA	diisopropiletilamina
	DMA	dimetilacetamida
10	DMAP	4-dimetilaminopiridina
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	dppfPdCl ₂	1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno dicloro-paladio
	DTT	ditiotreitol
15	ESMS	espectrometría de masas con electronebulización
	Et ₂ O	éter etílico
	EtOAc	acetato de etilo
	EtOH	alcohol etílico
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
20	LC-MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
	mCPBA	ácido meta-cloroperbenzoico
	Me	metilo
	MeOH	metanol
	MTBE	metil t-butil éter
25	MC	metil celulosa
	NAD	dinucleótido de nicotinamida y adenina
	NMP	N-metilpirrolidina
	Ph	fenilo
	TA o ta	temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C)
30	tBu	butilo terciario
	TBME	terc-butil metil éter
	TCA	ácido tricloroacético
	THF	tetrahidrofurano
	TEA	triethylamina
35	<i>Procedimiento de Síntesis</i>	

En general, el Compuesto 1 se puede preparar con métodos que se describen en el presente documento o con otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplo 1. Preparación de 2-cloro-6-(1-(2,2-difluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-b]piridin-5-ona (Compuesto [1006])



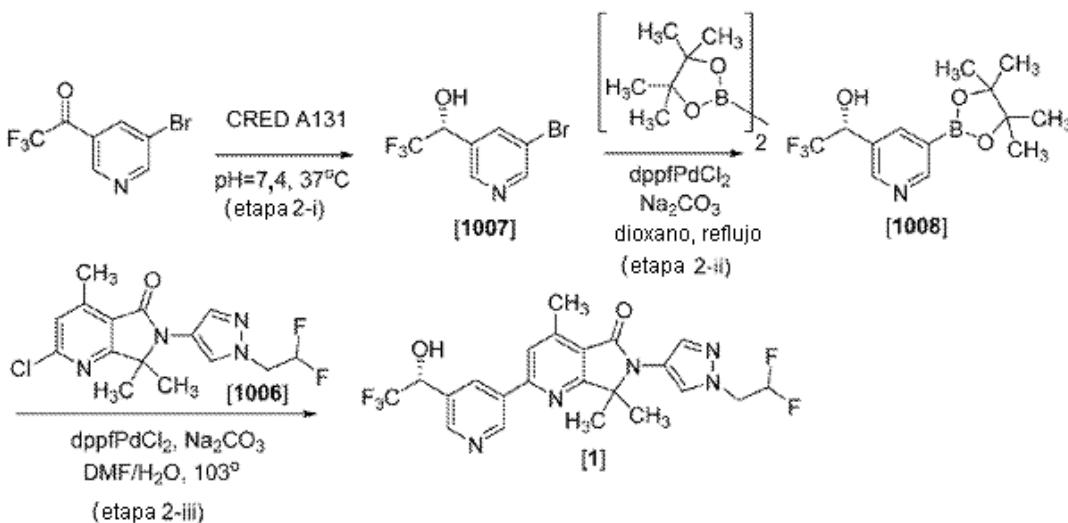
Esquema 1

- 5 Como se muestra en la etapa 1-i del Esquema 1, a una solución de 2,4-dimetylpiridina-3-carboxilato de etilo (Compuesto **1001**, 20,2 g, 112,5 mmoles) en diclorometano (100 ml) en una atmósfera de nitrógeno se añadió en porciones 1,3,5-tricloro-1,3,5-triazinano-2,4,6-triona (31,4 g, 135,0 mmoles) durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. El precipitado de color blanco resultante se filtró y el filtrado se lavó a continuación secuencialmente con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 x 100 ml) y solución salina saturada (100 ml). La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 2-(clorometil)-4-metilnicotinato de etilo (22,9 g, Compuesto **1002**) en forma de un aceite de color amarillo: ESMS (M+H) = 213,96. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 10 Como se muestra en la etapa 1-ii del Esquema 1, a una solución de 2-(clorometil)-4-metilnicotinato de etilo, (Compuesto **1002**, 112,0 g, 524,2 mmoles) en diclorometano (484 ml) se añadió ácido 3-cloroperoxibenzoico (141,0 g, 629,0 mmoles). La mezcla de reacción se agitó en una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluyó con diclorometano (200 ml) y se lavó secuencialmente con NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml), Na₂CO₃ acuoso saturado (100 ml de solución 2 M), y solución salina saturada. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para proporcionar 2-(clorometil)-3-(etoxicarbonil)-4-metilpiridina-1-óxido (Compuesto **1003**): ESMS (M+H) = 230,25. Este material se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional:
- 15 Como se muestra en la etapa 1-iii del Esquema 1, una solución de 2-(clorometil)-3-(etoxicarbonil)-4-metilpiridina 1-óxido (Compuesto **1003**, 69,3 g, 301,8 mmoles) en oxícloruro de fósforo (450,1 ml, 4,8 moles) se agitó en una atmósfera de nitrógeno y se calentó a 95 °C durante 60 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el oxícloruro de fósforo se retiró por destilación al vacío. El residuo coloreado de color oscuro resultante se disolvió en diclorometano (100 ml) y se vertió sobre hielo (500 g) en un vaso de precipitados de 1 l. La mezcla resultante se agitó durante 10 minutos. El pH de la mezcla se ajustó a pH ligeramente superior a 7 con una solución acuosa saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo de nuevo con diclorometano adicional. Las fases orgánicas combinadas se lavaron secuencialmente con solución salina saturada, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se pasó a través de un lecho de gel de sílice usando EtOAc/hexanos (1:3) para proporcionar un producto puro al 80 % (como se indica mediante análisis de RMN ¹H) después de retirada de los compuestos volátiles a presión reducida. Este material se purificó adicionalmente a través de cromatografía de media presión sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc al 10-25 %/hexanos, columna de Teledyne ISCO de 330 g) para proporcionar 6-cloro-2-(clorometil)-4-metilnicotinato de etilo (Compuesto **1004**, 36,5 g): ESMS (M+H) = 248,04.

Como se muestra en la etapa 1-iv del Esquema 1, a una solución de 1-(2,2-difluoroethyl)pirazol-4-amina (48,2 g, 327,5 mmoles) en isopropanol (1,7 l) se añadió 6-cloro-2-(clorometil)-4-metilnicotinato de etilo (Compuesto 1004, 65,0 g, 262,0 mmoles) seguido por *N,N*-diisopropiletil amina (45,6 ml, 262,0 mmoles). La mezcla de reacción se calentó a 55 °C durante 72 horas. La suspensión de color blanco espesa resultante se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, y se lavó con isopropanol (200 ml) adicional y éter dietílico (500 ml). El sólido resultante se secó a 50 °C durante una noche en un horno de vacío para proporcionar 56 g de 2-cloro-6-(1-(2,2-difluoroethyl)-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona (Compuesto 1005): RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d6) δ 8,28 (s, 1H), 7,87 (d, *J* = 0,5 Hz, 1H), 7,52 (s, 1H), 6,37 (tt, *J* = 54,9, 3,7 Hz, 1H), 4,85 (s, 2H), 4,67 (td, *J* = 15,2, 3,7 Hz, 2H), 2,65 (s, 3H). Este material contenía un 7 % del producto secundario sin ciclar [6-cloro-2-((1-(2,2-difluoroethyl)-1*H*-pirazol-4-il)amino)metil]-4-metilnicotinato de etilo] y se usó como tal en reacciones posteriores.

Como se muestra en la etapa 1-v del Esquema 1, a una solución de 2-cloro-6-(1-(2,2-difluoroethyl)-1*H*-pirazol-4-il)-4-metil-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona (Compuesto 1005, 46,0 g, 147,1 mmoles) en DMF (782,0 ml) se añadió yoduro de metilo (20,1 ml, 323,6 mmoles). La mezcla se enfrió a 5 °C y se añadió hidruro sódico (12,9 g, 323,6 mmoles de dispersión al 60 % en aceite mineral) en porciones durante 15 minutos. La mezcla de reacción se agitó a 3 °C durante 45 minutos. El análisis de HPLC mostraba una mezcla de productos de monometilación (10 %), bis-metilación (74 %), y tri-metilación (15 %) junto con consumo de material de partida. Se añadió una cantidad adicional de hidruro sódico (1,29 g, 32,36 mmoles de dispersión al 60 % en aceite mineral) y después de un periodo adicional de una hora, el análisis de HPLC mostraba un 84 % del producto deseado de bis-metilación y un 16 % del producto secundario tri-metilado. La reacción se interrumpió mediante la adición de NH₄Cl acuoso saturado (1 l), tiosulfato sódico (400 ml), y agua (1 l). La fase acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (800 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó a través de cromatografía de media presión sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc al 0-40 %/hexanos usando una columna Teledyne ISCO de 800 g) para proporcionar 2-cloro-6-(1-(2,2-difluoroethyl)-1*H*-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona (Compuesto 1006, 24 g) en forma de un sólido de color blanco: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d6) δ 8,21 (s, 1H), 7,83 (s, 1H), 7,54 (s, 1H) 6,58-6,25 (m, 1H), 4,67 (td, *J* = 15,1, 3,7 Hz, 2H), 2,65 (s, 3H), 1,51 (s, 6H).

Ejemplo 2. Preparación de (*R*)-6-(1-(2,2-difluoroethyl)-1*H*-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-2-(5-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)piridin-3-il)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona (Compuesto 1)



Esquema 2

Como se muestra en la etapa 2-i del Esquema 2, se añadió agua (10 l) a un reactor de 20 l, seguido de KH₂PO₄ (136 g). La mezcla se agitó hasta que se consiguió la homogeneidad para proporcionar un tampón de KH₂PO₄ 0,1 M. El pH de este tampón se ajustó a pH 7,5 mediante la adición de NaOH 2 M. La temperatura interna se llevó a 37 °C. Aproximadamente 500 ml de tampón se retiraron para su uso para la adición posterior de pasta celular de NAD y CRED A131 (Almac Group, Ltd.). Por consiguiente, una solución de NAD (20 g) en tampón (100 ml) se añadió a los 9,5 l restantes de tampón, seguido de una solución de 1-(5-bromopiridin-3-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (1020 g) en MTBE (1,5 l). Se usó isopropanol (1 l) para aclarar el matraz de adición en la reacción. La reducción se inició mediante la adición de una suspensión de pasta celular de CRED A131 (100 g) en tampón (400 ml) a la mezcla de reacción agitada. Durante el transcurso de la reacción, se tomaron muestras de reacción bifásicas (~2 ml) de la mezcla de agitación, se extrajeron usando EtOAc (10 ml), se secaron sobre MgSO₄, se evaporaron y se analizaron por RMN ¹H en DMSO-d6 para controlar la conversión del material de partida en producto. Después de 1 hora se observó una conversión de un 50 %. Después de 3 horas se observó una conversión > 99 %. El pH de la

reacción se ajustó a 11 con NaOH 2 M y se agitó durante 30 minutos con el fin de desnaturalizar la enzima. El pH se volvió a ajustar a 9 con HCl 2 M. Se añadieron EtOAc (5 l) y tierra de diatomeas (650 g) a la mezcla de reacción y la agitación continuó durante 10 minutos. La emulsión resultante se filtró a través de una capa de tierra de diatomeas para separar las fases orgánica y acuosa. El lecho se lavó con EtOAc (2 l) y la fase orgánica se separó. La fase acuosa se extrajo de nuevo con EtOAc (6 l) y las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución salina saturada (4 l) y se secaron mediante adición de MgSO₄ (200 g) y agitación durante 30 minutos. La filtración y la retirada de los compuestos volátiles al vacío proporcionó un aceite de color amarillo pálido que rápidamente solidificó después de un periodo de reposo. El sólido se rompió en trozos y se suspendió en ciclohexano (2 l). Se añadió EtOAc (~500 ml) a la mezcla que se agitó a 45 °C para disolver los sólidos. A continuación la mezcla se volvió a concentrar al vacío hasta que un sólido de color blanco fino comenzó a precipitar de la solución. Se añadió ciclohexano (2 l) adicional y la solución se enfrió a 0 °C con un baño de hielo. Después de agitar durante 30 minutos, los sólidos se recogieron por filtración, se lavaron con ciclohexano (500 ml), y se secaron en un horno de vacío para proporcionar 812 g de (*R*)-1-(5-bromopiridin-3-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ol (Compuesto 1007, 99,95 % de ee por análisis de HPLC) en forma de un sólido de color blanco granular: RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d6) δ 8,72 (s, 1H), 8,61 (s, 1H), 8,08 (s, 1H), 5,09-5,15 (m, 1H).

Como se muestra en la etapa 2-ii del Esquema 2, una solución de (1*R*)-1-(5-bromo-3-piridil)-2,2,2-trifluoro-etanol (Compuesto 1007, 49,5 g, 193,3 mmoles), 4,4,5,5-tetrametil-2-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1,3,2-dioxaborolano (58,9 g, 232,0 mmoles) y KOAc (37,9 g, 386,6 mmoles) en dioxano (1,2 l) se lavó abundantemente con nitrógeno durante 20 minutos. A la mezcla de reacción se añadió dppfPdCl₂*DCM (7,8 g, 9,7 mmoles). La mezcla se lavó abundantemente con nitrógeno durante otros 20 minutos y se calentó a refluo durante 2 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se filtró a través de una capa de Florisil (400 ml) y la torta se lavó con EtOAc al 50 %/CH₂Cl₂ (1,5 l). El filtrado resultante se concentró a presión reducida para proporcionar un aceite de color amarillo que se diluyó con hexanos (800 ml) y se concentró al vacío para proporcionar un sólido de color amarillo espumoso. La agitación del sólido de color amarillo con hexanos (800 ml) durante 2 horas dio como resultado un precipitado sólido de color blanco. El sólido de color blanco se recogió por filtración y se secó para proporcionar (1*R*)-2,2,2-trifluoro-1-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil] etanol (Compuesto 1008, 48,4 g): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,97 (s, 1H), 8,78 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 5,10-5,21 (m, 1H); 1,38 (s, 6H), 1,29 (s, 6H).

Como se muestra en la etapa 2-iii del Esquema 2, una solución de 2-cloro-6-(1-(2,2-difluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona, (Compuesto 1006, 42,0 g, 123,3 mmoles), (1*R*)-2,2,2-trifluoro-1-[5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3-piridil] etanol (Compuesto 1008, 46,7 g, 148,0 mmoles), y Na₂CO₃ (28,8 g, 271,3 mmoles) en DMF (630 ml) y agua (210 ml) se lavó abundantemente con nitrógeno durante 30 minutos. A la mezcla se le añadió dppfPdCl₂*DCM (2,99 g, 3,699 mmoles) y la mezcla se lavó abundantemente con nitrógeno durante otros 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 103 °C y se agitó durante 2 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con agua (2 l). La fase acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (1 l). Las fases orgánicas combinadas se concentraron al vacío a alto vacío para retirar DMF. El residuo se diluyó con EtOAc y se lavó con agua seguido de lavado con solución salina saturada. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró al vacío. El residuo en bruto se purificó a través de cromatografía de media presión sobre gel de sílice (gradiente de EtOAc al 0-100 %/hexanos usando una columna Teledyne ISCO de 1500 g) para proporcionar 54 g del producto deseado en forma de un sólido espumoso de color rojo claro. El sólido se disolvió en diclorometano, se empujó a través de un tapón de Florisil (200 ml) que se lavó sucesivamente con mezclas de EtOAc/CH₂Cl₂ [primero al 40 % (1 l), a continuación al 60 % (1 l), y a continuación al 80 % (1 l)]. Los filtrados se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se diluyó dos veces con heptanos (400 ml) y se concentró al vacío para proporcionar una torta, que se lavó a continuación con TBME para retirar el color amarillo claro y se secó en un horno de vacío a 60 °C durante 4 días para proporcionar (*R*)-6-(1-(2,2-difluoroetil)-1*H*-pirazol-4-il)-4,7,7-trimetil-2-(2,2,2-trifluoro-1-hidroxietil)piridin-3-ol)-6,7-dihidro-5*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5-ona (Compuesto 1, 47 g): RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 9,33 (s, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 6,14 (tt, *J* = 55,4, 3,6 Hz, 1H), 5,28 - 5,11 (m, 1H), 4,51 (td, *J* = 13,5, 4,2 Hz, 2H), 4,33 (d, *J* = 4,6 Hz, 1H), 2,82 (s, 3H), 1,68 (s, 6H).

Potencia In Vitro Contra Quinasa Lipídica PI3K-gamma

Ejemplo 3. Ensayo de inhibición de PI3K

Usando un Biomek FX de Beckman Coulter, se añadieron 1,5 µl de cada una de diez disoluciones en serie 2,5 veces del compuesto de la invención en DMSO al 100 % a un pocillo individual (en lo sucesivo en el presente documento, "pocillo de ensayo") en una placa de poliestireno de 96 pocillos [Corning, Artículo N.º 3697 de Costar]. Un pocillo de ensayo también contenía 1,5 µl de DMSO sin compuesto. Otro pocillo contenía un inhibidor en DMSO a una concentración conocida por inhibir completamente la enzima, (en lo sucesivo en el presente documento "pocillo de fondo"). Usando un Titertek Multidrop, en cada pocillo se añadieron 50 µl de Mezcla de [HEPES 100 mM a pH 7,5, NaCl 50 mM, DTT 10 mM, 0,2 mg/ml de BSA, fosfatidilinositol(4,5)-bisfosfato diC16 (PI(4,5)P₂ 60 µM; Avanti Polar Lipids, N.º de Cat. 840046P) e isoforma PI3K de interés (véase la Tabla 1 para concentraciones de isoforma)]. Para iniciar la reacción, en cada pocillo se añadieron 50 µl de Mezcla de ATP [MgCl₂ 20 mM, ATP 6 µM (100 µCi/µmol de ³³P-ATP, seguido de incubación de los pocillos durante 30 min. a 25 °C. Las concentraciones finales en cada pocillo eran HEPES 50 mM a 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 25 mM, DTT 5 mM, 0,1 mg/ml de BSA, PI(4,5)P₂ 30 µM, ATP 3 µM, y

la isoforma PI3K de interés (véase la Tabla 2). Las concentraciones de compuesto final en cada pocillo variaron de 10 µM a 1 nM.

Tabla 1

Concentraciones de Isoforma PI3K	PI3K-α	PI3K-β	PI3K-γ	PI3K-δ
Concentración enzimática en Mezcla de Reacción	4 nM	20 nM	4 nM	4 nM
Concentración enzimática final	2 nM	10 nM	2 nM	2 nM

Después de incubación, las reacciones en cada pocillo se interrumpieron mediante la adición de 50 µl de solución de parada [TCA al 30 %/Agua, ATP 10 mM]. Cada mezcla de reacción interrumpida se transfirió a continuación a una placa de filtro de fibra de vidrio de 96 pocillos [Corning, Artículo N.º 3511 de Costar]. La placa se filtró a vacío y se lavó tres veces con 150 µl de TCA al 5 %/agua en un Lavador ELX-405 Auto Plate de Bio-Tek Instruments modificado. En cada pocillo se añadieron 50 µl de fluido de centelleo y la lectura de la placa se realizó en un aparato de recuento de centelleo líquido TopCount™ NXT de Perkin-Elmer para obtener recuentos de ^{33}P que representan valores de inhibición.

El valor para el pocillo de fondo se restó del valor obtenido para cada pocillo de ensayo y los datos se ajustaron con respecto a la ecuación de Ki de unión estrecha competitiva que se describe en *Comments Mol. Cell Biophys.* 2: 347-368, 1985 de Morrison y Stone. El grado de inhibición de PI3K-gamma para el Compuesto 1 varía linealmente con la concentración de ATP lo que demuestra inhibición competitiva, con un valor de Ki de 8 +/- 4 nM. Además, la selectividad de la isoforma también se observó a medida que el Compuesto 1 se sometía a ensayo contra las isoformas PI3K-alfa, PI3K-beta, y PI3K-delta y se determinó que tenía una selectividad de más de 15 veces para PI3K-gamma como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Selectividad de la Isoforma PI3K para el Compuesto 1

Isoforma	Veces de Selectividad
PI3K-α	0,28 ± 0,09
PI3K-β	0,22 ± 0,03
PI3K-δ	0,16 ± 0,05
PI3K-γ	0,008 ± 0,004
	ND

Potencia Celular

Las PI3K son complejos de múltiples unidades formados por una subunidad reguladora y una subunidad catalítica. Esta clase de enzimas cataliza la fosforilación de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) lugar al segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). La activación de receptores conduce a un aumento transitorio de los niveles de PIP3. PIP3 actúa como un sitio de acoplamiento en la membrana plasmática, reclutamiento y activación de proteínas que contienen el dominio de homología de pleckstrina (PH), tales como las quinasas Akt, PDK-1, Tek, etc. A continuación éstas regulan funciones celulares fundamentales tales como, metabolismo, migración, estallido respiratorio, etc. Dado que los efectores cadena abajo son comunes en la ruta de señalización de PI3K, son los receptores los que determinan cuál es la isoforma de PI3K que se recluta después de activación. Basándose en esto, se usó un número de ensayos bioquímicos basados en pAkt ensayos funcionales para analizar la potencia y la selectividad de inhibidores PI3K-gamma con respecto a las otras isoformas PI3K.

Ejemplo 4. MCP-1 estimulaba pAkt en células THP-1

Las quimioquinas tales como MCP-1 se unen a sus receptores dando como resultado una activación de la ruta de señalización de PI3K-gamma. PI3K-gamma conduce a la generación de PIP3 y a la activación de moléculas cadena abajo tales como PDK-1 y Akt. La fosforilación de Akt es una medida de actividad de PI3K en la célula. En este ensayo, las células THP-1 (línea de células monocíticas humanas) se dejan en ayunas durante una noche para agotar los niveles de pAkt. La estimulación posterior con MCP-1 durante 3 minutos conduce a la fosforilación de Akt inducida por PI3K-gamma en los sitios de Treonina 308 y Serina 473. Las células se fijaron y se tiñeron para fosfoAkt intracelular (Ser 473) a continuación se analizaron usando un citómetro FACSCalibur™ de BD dando como resultado una medida de la actividad de PI3K-gamma celular. En este ensayo el Compuesto 1 presentaba una IC_{50} de $0,24 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Véase la Tabla 3.

Tabla 3. Potencia del Compuesto 1 en ensayos *in vitro* dependientes de PIK3α/β/δ

Ensayo Celular	Dependencia de isoforma PIK3	IC_{50} (μM) Promedio ± Desviación Típica	Número de Ensayos (N)
THP-1/MCP-1/pAkt	PI3K-gamma	0,24 ± 0,07	20
Estallido oxidativo de Leucocitos Aislados	PI3K-gamma	0,22 ± 0,08	3
Estallido oxidativo de Sangre Completa	PI3K-gamma	0,57 ± 0,08	3

Ejemplo 5. Ensayo de estallido oxidativo en sangre completa y leucocitos

5 Neutrófilos, monocitos y macrófagos son mediadores fundamentales de la inmunidad innata. Liberan especies reactivas del oxígeno (ROS) como parte de la respuesta inflamatoria inmunitaria innata. La producción de ROS está inducida por mediadores inflamatorios tales como quimoquininas, péptidos bacterianos y complementos que reclutan las células inmunitarias innatas al sitio de información. Estos mediadores inflamatorios desencadenan la activación de PI3K-gamma e inician una cascada de señalización cadena abajo que conduce al ensamblaje del complejo de NADPH oxidasa completo en la membrana plasmática generando ROS. La actividad funcional de PI3K-gamma se midió en sangre completa y en neutrófilos y monocitos de la capa leucocítica a través de la generación de ROS. Las células se estimulan con TNF-alfa durante 10 minutos, a continuación con péptido quimiotáctico obtenido a partir de la pared celular bacteriana, fMLP, durante 20 minutos, cargadas con un colorante no fluorescente, dihidrorodamina 1,2,3 (DHR). Las ROS producidas por las células oxidan DHR a rodamina fluorescente produciendo un aumento del contenido de rodamina fluorescente en las células. La actividad funcional de PI3K-gamma se mide mediante la capacidad de neutrófilos y monocitos para generar ROS después de estimulación con fMLP. Las muestras de leucocitos de sangre completa se analizaron en un FACSCalibur™ de BD para cuantificar las células positivas para rodamina fluorescente. Las células de la capa leucocítica generan unas IC_{50} en ausencia de suero y el ensayo de sangre completa genera unas IC_{50} en presencia de suero. El Compuesto 1 presentaba una IC_{50} de 0,22 μM en el ensayo de leucocitos de la capa leucocítica y 0,57 μM en ensayo de sangre completa. Véase la Tabla 3.

Ejemplo 6. CSF-1 estimulaba pAkt en células THP-1

25 Factores de crecimiento, citoquinas y otros ligandos de tirosina quinasas receptoras, tales como CSF1, se unen a sus receptores lo que conduce a la activación de la ruta de señalización de PI3K de clase IA. La activación de PI3K conduce a la generación de PIP3 y la activación de moléculas cadena bajo tales como PDK-1 y Akt. La fosforilación de Akt es una medida de la actividad de PI3K en la célula. Las células THP-1 (una línea de células monocíticas humanas) se mantienen en ayunas durante una noche para agotar los niveles de pAkt. La estimulación con CSF-1 durante 5 minutos conduce a fosforilación de Akt inducida por PI3Kα/β/δ en los sitios de Treonina 308 y Serina 473.

30 30 Las células se fijaron y se tiñeron para fosfoAkt intracelular (Ser 473) y a continuación se analizaron en el citómetro FACSCalibur™ de BD. Se trata de una medida de la inhibición de PI3K de Clase IA. El Compuesto 1 presentaba una $IC_{50} > 9,7 \mu M$ en este ensayo, lo que demuestra selectividad con respecto a las PI3K de Clase IA. Véase la Tabla 4.

Ejemplo 7. Ensayo de proliferación de linfocitos B humanos

35 35 Los linfocitos B dependen en gran medida de PI3K5 para su desarrollo y actividad. PI3K-gamma tiene un papel esencial y no superfluo en la vía de señalización del complejo de receptores de linfocitos B (BCR). Tanto el influjo como la proliferación de Ca⁺ inducidos por IgM se atenúan en ratones que carecen de PI3K-δ o con inhibidores de PI3K-δ. PI3K-gamma no tiene ningún papel que desempeñar en ninguna actividad de los linfocitos B. La especificidad del complejo BCR para la isoforma PI3K-gamma hace que éste sea un ensayo de PI3K-gamma ideal para evaluar el alcance de la inhibición de PI3K-gamma en células. Los linfocitos B humanos purificados se estimulan con anti-IgM en presencia de compuestos de ensayo. Cuatro días más tarde, la viabilidad/proliferación celular se midió usando Cell Titer-Glo para medir el contenido de ATP de las células en el pocillo. La falta de o la proliferación reducida es una medida del alcance de la inhibición de PI3K-gamma. El Compuesto 1 tiene una IC_{50} de 3,05 ± 0,44 μM lo que demuestra una ventana de selectividad de 11 veces con respecto al PI3K-δ. Véase la Tabla 4.

Ejemplo 8. Ensayo de proliferación de HUVEC

50 50 Las PI3K son moléculas de señalización importantes cadenas debajo de un número de factores de crecimiento que regulan la supervivencia celular, crecimiento y entrada del ciclo celular. Las isoformas tanto PI3K-alfa como PI3K-beta regulan la entrada del ciclo celular; la inhibición de cualquier isoforma conduce una reducción del crecimiento celular. Las HUVEC son células endoteliales primarias de la vena umbilical humana expresan las isoformas tanto PI3Kα como PI3Kβ. La inhibición de cualquiera o de ambas isoformas PI3K-alfa o PI3K-beta inhibirá el crecimiento celular de las HUVEC. Los compuestos se siembran sobre las HUVEC, la proliferación/viabilidad celular se mide 96 horas después del tratamiento con el compuesto usando Cell Titer-Glo para medir el contenido de ATP de las células en el pocillo. La falta de o la reducción de la proliferación es una medida del alcance de la inhibición de PI3K-alfa y/o

PI3K-beta. El Compuesto 1 tiene una IC_{50} de > 19 μM en este ensayo, lo que demuestra una selectividad de > 74 veces con respecto a PI3K-alfa/beta. Véase la Tabla 4.

Ejemplo 9. Ensayo de proliferación de MCF-7

La ruta de señalización de PI3K-Akt regula muchos procesos celulares normales incluyendo la proliferación, supervivencia y crecimiento celulares que son fundamentales para la tumorigénesis. La desregulación de la ruta de señalización de PI3K se produce comúnmente en cánceres humanos. MCF7 es una línea de células de carcinoma de mama humanas que tiene una mutación activante heterocigota E545K PI3K α en el dominio helicoidal de la proteína p110 α que conduce a hiperactividad de la ruta de PI3K-alfa. La inhibición de la señalización de PI3K-alfa en las células MCF7 inhibe el crecimiento celular y por lo tanto los inhibidores de PI3K-alfa se pueden evaluar en el ensayo de proliferación de MCF7. Los compuestos añaden a células MCF7, la proliferación/viabilidad celular se mide 96 horas después del tratamiento con el compuesto usando Cell Titer-Glo para medir el contenido de ATP de las células en el pocillo. La falta de o la reducción de la proliferación es una medida del alcance de la inhibición de PI3K-alfa. El Compuesto 1 tiene una IC_{50} de > 17 μM en este ensayo, demostrando de este modo una selectividad de > 67 veces con respecto a PI3K-alfa. Véase la Tabla 4.

Como se ha mostrado anteriormente, el Compuesto 1 tiene una potencia excelente, 0,25 μM en ensayos celulares asociados con PI3K-gamma, tiene la selectividad de 12 veces con respecto a PI3K-delta, y una selectividad de 40-80 veces con respecto a PI3K-alfa y PI3K-beta en ensayos basados en células.

Tabla 4. Potencia del Compuesto 1 en ensayos *in vitro* dependientes de PI3K $\alpha/\beta/\delta$

Ensayo Celular	Dependencia de isoforma PI3K	IC_{50} (μM) Prom ± D.T.	Número de Ensayos (N)
THP-I/CFS-1/pAkt	PI3K-alfa/beta/delta	> 9,7 ± 0,7	20
linfocitos B/IgM/Proliferación	PI3K-gamma	3,05 ± 0,44	5
Proliferación de HUVEC	PI3K-alfa/beta	> 19	5
Proliferación de MCF7	PI3K-alfa	> 17**	4

* Datos de ensayo individual (μM) - > 20, > 20, 19,8

** Datos de ensayo individual (μM) - 15,7, > 20, 18, 17

Metabolismo del Fármaco

Ejemplo 10. Metabolismo del Compuesto 1 con Enzimas CYP Recombinantes

Los microsomas que contenían enzimas CYP recombinantes (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 y 3A4) se usaron para determinar qué CYP cataliza la oxidación del Compuesto 1. Por consiguiente, el Compuesto 1 (1 μM) se incubó con las CYP recombinantes individuales en presencia del cofactor NADPH. Porcentaje de fármaco precursor que permanecía al final del periodo de incubación se determinó por LC-MS/MS y se comparó con el presente al comienzo. Los resultados se muestran en la Tabla 5. El metabolismo del Compuesto 1 se detectó solamente en la incubación con CYP3A4, aunque a una tasa aparente baja.

Tabla 5. Estabilidad del Compuesto 1 en Incubaciones con Enzimas CYP Recombinantes*

CYP	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4
% de Precursor Restante @ 30 min	105	107	105	108	118	100	105	92

*Los datos se expresan como Media (DT)

Ejemplo 11. Inhibición de Enzimas CYP por el Compuesto 1

Se evaluó el potencial del Compuesto 1 (0,01 a 100 μM) a inhibir de forma reversible enzimas CYP (CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4) en microsomas de hígado humano. Los ensayos de inhibición se realizaron con sondas de CYP selectivas para cada enzima CYP a concentraciones específicas del sustrato (cerca de su valor de constante de disociación (K_m)). Los datos se muestran en la Tabla 6. El Compuesto 1 era un inhibidor moderado de las CYP 1A2, 2B6 y 2C8; los valores de IC_{50} variaban de 4-7 μM .

Tabla 6. Inhibición por el Compuesto 1 de Enzimas CYP en Microsomas de Hígado Humano

Sustrato	Enzima	IC_{50} (μM)
Fenacetina 30 μM	CYP1A2	7

Sustrato	Enzima	IC_{50} (μM)
Buproprión 100 μM	CYP2B6	4
Paclitaxel 2,5 μM	CYP2C8	7
Diclofenaco 2,5 μM	CYP2C9	32
S-Mefenitoína 30 μM	CYP2C19	21
Bufuralol 10 μM	CYP2D6	64
Testosterona 50 μM	CYP3A4	> 75
Midazolam 2,5 μM	CYP3A4	19

La inhibición de CYP3A4 dependiente del tiempo por el Compuesto 1 también se evaluó en microsomas de hígado humano usando el ensayo desplazamiento de IC_{50} . En el estudio, el Compuesto 1 de 0,1 a 50 μM se incubó previamente con microsomas de hígado humano en presencia y ausencia de NADPH durante 0 y 30 minutos. Las 5 incubaciones se diluyeron a continuación 10 veces con tampón y la actividad de CYP3A4 (testosterona-6-beta-hidroxilasa) restante se midió durante un periodo de 10 minutos. No se produjo ningún cambio significativo (desplazamiento de $IC_{50} = 1$) en la IC_{50} del Compuesto 1 en presencia o ausencia de NADPH.

Este resultado se verificó en un estudio de seguimiento en el que la inhibición de CYP3A4 dependiente del tiempo en 10 microsomas de hígado humano se evaluó después de la incubación previa el Compuesto 1 a cualquiera de 10 o 50 μM durante un periodo de 0, 5, 10, 15 y 30 minutos. La constante de la tasa observada para la pérdida de actividad de CYP3A4 en el estudio (Kobs) era de 0,0039/min en ambas concentraciones sometidas a ensayo en comparación con Kobs = 0,053/min para mifepristona, el control positivo. Los datos a partir de ambos estudios demuestran que el Compuesto 1 no inhibe CYP3A4 de una manera dependiente del tiempo.

15 Ejemplo 12. Inducción enzimática

El potencial del Compuesto 1 para activar el receptor X de pregnano (PXR) se evaluó con respecto a un intervalo 20 seis concentraciones de 0,1-30 μM en células DPX2, una línea de células de hepatoma humano que se sobreexpresa de forma estable con el gen PXR humano y el indicador de luciferasa unido a dos promotores en el gen CYP3A4 humano. Como control positivo se usó Rifampicina. En este ensayo, el Compuesto 1 mostraba un nivel insignificante de activación proporcionan una respuesta que era de un 5 % con respecto al control positivo con un valor de $CE_{50} > 30 \mu M$.

25 El potencial del Compuesto 1 para inducir CYP1A2 y CYP3A4 también se evaluó en hepatocitos. El Compuesto 1 a concentraciones de 0,1-30 μM se incubó con hepatocitos humanos primarios crioconservados cultivados a partir de tres donantes diferentes durante 48 horas y se comparó con el efecto de los controles positivos (es decir, inductores de CYP: Omeprazol 50 μM para CYP1A2 y rifampicina 10 μM para CYP3A4). La actividad de CYP se determinó monitorizando la formación de metabolitos de sustratos de sonda de CYP específica (fenacetina para CYP1A2 y 30 testosterona para CYP3A4) usando LC-MS/MS. El ácido ribonucleico mensajero de CYP (ARNm) se analizó por RT-PCR para confirmar el potencial de inducción de CYP. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

35 El cambio en la actividad de CYP1A2 o CYP3A4 y los niveles de ARNm en los tres lotes de hepatocitos después de exposición al Compuesto 1 era inferior a un 20 % del control positivo. Estos datos *in vitro* indican que el Compuesto 1 tienen potencia bajo para inducir CYP1A2 o CYP3A4 después de exposición de 48 horas en hepatocitos humanos.

Tabla 7. Inducción de CYP1A2 y CYP3A4 con el Compuesto 1 en Hepatocitos Humanos

Tratamiento	Potencial de Inducción de CYP1A2 ^a		
	N.º de Lote de Hepatocitos Humanos		
	LMP	YOW	8123
O-Desalquilación de Fenacetina (mensaje de ARNm)			
Omeprazol 50 μM	36,3 (71,5)	17,9 (93-6)	25,7 (118,0)
Compuesto 1 0,5 μM	0,7 (0,6)	1,1 (0,5)	0,6 (0,6)*
Compuesto 1 1,0 μM	0,8 (0,6)	1,1 (0,4)	0,5 (0,5)
Compuesto 1 5,0 μM	0,9 (0,7)	1,1 (0,6)	0,8 (0,5)
Compuesto 1 10,0 μM	1,0 (0,8)	1,2 (1,3)	0,7 (1,2)
Compuesto 1 20,0 μM	1,1 (0,7)	1,3 (0,8)	1,2 (2,6)

Tratamiento	Potencial de Inducción de CYP1A2 ^a		
	N.º de Lote de Hepatocitos Humanos		
	LMP	YOW	8123
O-Desalquilación de Fenacetina (mensaje de ARNm)			
Compuesto 1 30,0 µM	1,1 (1,4)	1,5 (NR ²)	1,3 (NR ²)
Tratamiento	Potencial de Inducción de CYP1A2 ^a		
	N.º de Lote de Hepatocitos Humanos		
	LMP	YOW	8123
Testosterona-6β-Hidroxilación (mensaje de ARNm)			
Rifampicina 10 µM	13,2 (10,4)	16,0 (29,3)	40,4 (210,3)
Compuesto 1 0,5 µM	0,9 (1,0)	1,0 (1,3)	0,3 (0,4)
Compuesto 1 1,0 µM	0,8 (0,7)	0,8 (0,2)	0,5 (0,3)
Compuesto 1 5,0 µM	1,1 (1,1)	0,9 (NR ¹)	0,4 (0,5)
Compuesto 1 10,0 µM	1,1 (1,5)*	0,8 (NR ¹)	0,4 (1,1)
Compuesto 1 20,0 µM	1,4 (3,0)	0,6 (NR ¹)	0,6 (0,7)
Compuesto 1 30,0 µM	1,0 (2,5)	0,6 (NR ¹)	0,7 (NR ²)

* Expresado como factor de cambio con respecto al control de disolvente

NR¹ no informado ya que la respuesta era menor que la del control del vehículo

NR² no informado debido a citotoxicidad

Ejemplo 13. Permeabilidad del Potencial de Eflujo

- La permeabilidad del Compuesto 1 se evaluó usando líneas de células de tipo silvestre tanto Caco-2 como de riñón canino MadinDarby (MDCK). Las células se expusieron a fármaco en tampón en el lado apical (medición de la permeabilidad en la dirección de A a B) o en el lado basolateral (medición de la permeabilidad en la dirección de B a A) y se incubaron a 37 °C durante una hora. Los resultados se muestran en la Tabla 7. La permeabilidad será elevada en la dirección de A a B en las líneas de células tanto MDCK como Caco-2 (33 y 18×10^{-6} cm/s, respectivamente).
- Una Evaluación de si el Compuesto 1 es un sustrato de transportadores de eflujo se realizó usando la línea de células MDCK que se sobreexpresa con P-gp humano (MDR). El transporte vectorial se detectó en esta línea celular (proporción de eflujo = 35,1), lo que indica que el Compuesto 1 es un sustrato de P-gp. Véase la Tabla 8.
- Tabla 8. Sumario de Proporción de Eflujo y Recuperación del Compuesto 1 en Líneas Celulares Caco-2, MDCK-WT y MDCK-MDR1

Línea Celular	Conc. Compuesto 1	P_{ap} Prom. ($\times 10^{-6}$ cm/s) \pm DT	% Prom. de Recuperación \pm DT	Proporción de Eflujo
Caco-2	5 µM	A > B	32,6	87
		B > A	60,7	96
MDCK-WT	1 µM	A >B	17,55	90
		B > A	23,78	93
MDCK-MDR1	1 µM	A > B	0,98	97
		B > A	34,33	87

Farmacocinética in vivo

Ejemplo 14. Dosificación Intravenosa de Bolo

- 5 Después de la administración intravenosa de un solo bolo, el Compuesto 1 presentaba una eliminación sistemática baja y una semivida larga en todas las especies sometidas a ensayo. Véase la Tabla 9. Los valores de eliminación del Compuesto 1 representan aproximadamente un 5,4 %, 3,6 %, 13 % y un 26 % del flujo de sangre hepática en ratón, rata, perro y mono. El volumen de distribución era mayor que el agua del organismo total, lo que indica distribución del Compuesto 1 a tejidos.

10 Tabla 9. Promedio de Parámetros Farmacocinéticos para el Compuesto 1 Después de Administración IV de un Solo Bolo

Especie	Dosis Nominal ^b (mg/kg)	AUC _{TODO} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	DN_AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	CL (ml/min/kg)	% HBF ^a	T _{1/2} (h)	V _{ss} (l/kg)
Ratón	0,45	1,09	1,53	3,4	4,9	5,4	4,3	1,8
Rata	0,5	2,69	3,1	6,2	2,8	3,6	8,2	1,8
Perro	0,5	1,9	2,0	4,0	5,4	13	10,7	3,9
Mono	0,5	0,7	0,74	1,5	11,5	26	6,6	3,3

^a HBF, flujo de sangre hepático

^b Las dosis medidas fueron 0,32, 0,47, 0,5 y 0,46 mg/kg para ratón, rata, y mono, respectivamente. Los cálculos PK se basaron en la dosis nominal.

Ejemplo 15. Biodisponibilidad Oral

- 15 Como se muestra en la Tabla 10, la biodisponibilidad oral del Compuesto 1 era elevada (> 80 %) después de la administración de una sola dosis del Compuesto 1 a ratón, rata, perro y mono. La biodisponibilidad en mono (>100 %) se puede explicar por la diferencia de diez veces entre las dosis IV y oral. El Compuesto 1 se absorbía rápidamente en todas las especies, con una concentración sistémica máxima observada en aproximadamente una a tres horas de dosificación.

20 Tabla 10. Promedio de Parámetros Farmacocinéticos para el Compuesto 1 Después de Administración Oral Individual a Ratón, Rata, Perro y Mono

Especie	Dosis Nominal ^c (mg/kg)	AUC _{TODO} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	DN_AUC _{INF} ($\mu\text{g}^*\text{h}/\text{ml}$)	C _{máx} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T _{máx} (h)	T _{1/2} (h)	MRT (h)	F %
Ratón ^a	1	2,72	2,76	2,76	0,29	2	3,8	5,8	81
Rata ^b	1	5	5,11	5,14	0,26	3,33	12,5	18,3	84
Perro ^b	3*	9,11	9,29	3,1	1,29	0,83	7,3	9	77
Mono ^b	5	12,3	12,5	2,5	1,35	1,67	8,5	10,5	126

^a Vehículo: 0,2 %, MC/1 % de SLS

^b Dispersión secada por pulverización, vehículo: 2 % de TPGS/1,5 % de HPMCAS-HF/1,5 % de PVP-VA con citrato 50 mM a pH 5

^c Las dosis medidas fueron 0,95, 0,68, 2,6 y 4,4 mg/kg para ratón, rata, y mono, respectivamente. Los cálculos PK se basaron en la dosis nominal.

- 25 La Tabla 11 proporciona datos farmacocinéticos para inhibidores de PI3K que se describen en la Pub. de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2011/087776 ("la solicitud '776"), cada uno de los cuales tiene la misma estructura del farmacóforo núcleo que la del Compuesto 1. véanse los compuestos 705, 709, 735, y 772 en las páginas 229, 229, 234, y 242, respectivamente, de la solicitud '776. La eliminación plasmática sistémica del Compuesto 1 después de administración intravenosa era significativamente menor (de 2,5 veces a 8 veces) que la observada en estudios con otros compuestos. Los datos de eliminación plasmática están de acuerdo con los datos de valores intravenosos, exposición oral, AUC, y C_{máx}. Estos datos muestran que el Compuesto 1 tiene un perfil farmacocinético inesperadamente favorable con respecto a estos compuestos.

Tabla 11. Promedio de Parámetros Farmacocinéticos para el Compuesto 1 Administrado por Vía Oral con respecto a Compuestos de Comparación

Número del Compuesto	Estructura	AUC IV Rata ¹ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	CL IV Rata (ml/min/kg)	AUC de PO de Rata ² ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$)	C _{máx} de PO de Rata ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
1		3,1	2,8	18	1,0
A (N.º 705 en WO 2011/087776)		0,22	22	0,3	0,06
B (N.º 709 en WO 2011/087776)		0,33	22	0,6	0,12
C (N.º 735 en WO 2011/087776)		0,59	11	3	0,2
D (N.º 772 en WO 2011/087776)		1,2	7	9	0,5

¹ Estudio de bolo intravenoso, 0,5 mg/kg de dosis nominal; Vehículo 355 PEG400/25 % de NMP/40 % de Agua

² Estudio de dosis oral, 3 mg/kg de dosis nominal; vehículo 0,2 % de MC/1 % de SLS

Ejemplo 16. Distribución tisular en ratas

El Compuesto 1 se distribuía bien en la mayoría de los tejidos después de una dosis oral de 5 mg/kg administrada a ratas macho. Véase la Tabla 12. El cerebro y el líquido cefalorraquídeo (CSF) eran los órganos que mostraban una exposición muy baja al Compuesto 1 con una $C_{máx}$ de 111 ng/g y 27 ng/ml, respectivamente (< 0,1 % de la exposición plasmática). El Compuesto 1 se distribuía bien en el hígado y en el riñón, con una $C_{máx}$ de 11400 y 4770 ng/g, respectivamente. La proporción de tejido con respecto a plasma seguía la tendencia de hígado > riñón > corazón > pulmón > bazo > cerebro > CSF. La cinética de eliminación del Compuesto 1 en cada órgano examinado seguía cinética plasmática. No había evidencia de acumulación tisular del Compuesto 1 después de una administración de una sola dosis.

Tabla 12. Promedio de Concentraciones en Tejido y Plasma y Proporción de Tejido con respecto a Plasma del Compuesto 1 Despues de una Sola Dosis Oral de 5 mg/kg

Tejido	Concentración del Compuesto 1 (ng/ml o ng/g)					Proporción de Tejido con respecto a Plasma				
	0,5	2	7	24	48	0,5	2	7	24	48
h después de dosis	0,5	2	7	24	48	0,5	2	7	24	48
Cerebro	74	129	111	30	9,35	0,04	0,07	0,05	0,06	0,07
CSF	20	23,3	27	5	BQL	0,01	0,01	0,01	0,01	BQL
Corazón	1730	3280	3100	771	196	0,98	1,67	1,40	1,46	1,39
Riñón	3070	4980	4770	1600	673	1,75	2,54	2,16	3,03	4,76
Hígado	8710	13700	11400	3010	750	4,96	6,99	5,13	5,69	5,32
Pulmón	2180	2710	2700	617	185	1,24	1,38	1,22	1,17	1,31
Bazo	1290	1790	491	125	BQL	0,74	1,15	0,81	0,93	0,88
Plasma	1760	1960	2210	592	141	--	--	--	--	--

BQL = Por debajo del límite cuantificable. El compuesto se dosificó como dispersión seca por pulverización en un 2 % de TPGS/1,5 % de HPMCAS-HF/1,5 % de PVP-VA con citrato 50 mM a pH 5.

Ejemplo 17. Compuesto 1 en modelo de CIA de ratón

El Compuesto 1 se sometió a ensayo en el modelo terapéutico de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratón a 2,5 mg/kg BID (5 mg/kg/día), 5 mg/kg BID (10 mg/kg/día) o 10 mg/kg BID (20 mg/kg/día). Fostamatinib, un inhibidor de molécula pequeña de Syk usado como patrón de referencia, se dosificó por vía oral a 30 mg/kg BID (60 mg/kg/día). Los compuestos se dosificaron durante 10 días en un régimen de dosificación BID de 12/12 horas hasta el final del estudio. El Compuesto 1 se formuló en un 0,2 % de MC, un 1 % de SLS. El volumen de dosificación fue de 10 ml/kg. Las muestras en plasma terminal se recogieron a las 2, 4 y 12 horas después de la última dosis. Las cuatro patas y ambas rodillas se recogieron y se procesaron para histopatología.

El tratamiento con el Compuesto 1 mostraba un efecto beneficioso significativo en el modelo de CIA tal como se determina mediante evaluación de puntuaciones de artritis clínica e histopatología de las articulaciones. Las puntuaciones de artritis medidas diariamente estaban significativamente reducidas con respecto a lo normal para ratones tratados con 2,5 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d2-11), 5 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d2-11), 10 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d2-11), o 30 mg/kg BID de Fostamatinib (*d2-11) en comparación con controles de vehículo. Véase la Figura 1. Cuando se consideran solamente las patas que muestran signos clínicos de artritis en el momento del reclutamiento (patas terapéuticas), las puntuaciones de artritis clínica estaban significativamente reducidas para ratones tratados con 5 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d5-11) o 10 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d2-11), pero no para los otros grupos de tratamiento con 30 mg/kg BID de Fostamatinib. Véase la Figura 2. Cuando se consideran solamente las patas que no muestran signos clínicos de artritis en el momento del reclutamiento (patas profilácticas), las puntuaciones de artritis clínica estaban significativamente reducidas para ratones tratados con 2,5 mg/kg BID de Compuesto 1 (*d2, 4-11), 5 mg/kg Compuesto 1 BID (*d2-11), 10 mg/kg Compuesto 1 BID (*d2-11) o 30 mg/kg BID de Fostamatinib (*d5-9) en comparación con controles de vehículo. Véase la Figura 3.

Como se muestra en la Tabla 13, las puntuaciones de artritis clínica expresadas como área bajo la curva (AUC) estaban significativamente reducidas con respecto a lo normal para ratones tratados con 30 mg/kg BID de Fostamatinib (25 %), 2,5 mg/kg BID de Compuesto 1 (28 %), 5 mg/kg BID de Compuesto 1 (63 %) o 10 mg/kg BID de Compuesto 1 (89 %) en comparación con controles de vehículo. Cuando se consideran solamente las patas, el AUC de las puntuaciones de artritis estaba significativamente reducida para ratones tratados con 10 mg/kg BID de Compuesto 1 (79 %). Cuando se consideraban solamente las patas profilácticas, el AUC de las puntuaciones de artritis estaba significativamente reducida para ratones tratados con 30 mg/kg BID de Fostamatinib (32 %), 2,5 mg/kg BID de Compuesto 1 (42 %), 5 mg/kg BID de Compuesto 1 (81 %) y 10 mg/kg BID de Compuesto 1 (98 %) en comparación con controles de vehículo.

Tabla 13. Puntuaciones de artritis clínica para el Compuesto 1 en el modelo de CIA

Tratamiento (mg/kg BID)	Datos de Puntuación Clínica			Puntuación Sumada de Histopatología		
	AUC Puntuación Todas las Patas (ETM)	AUC Puntuación Pata Terapéutica (ETM)	AUC Puntuación Pata Profiláctica (ETM)	Seis Articulaciones (ETM)	Patas (ETM)	Rodillas (ETM)
Sin tratamiento previo	*0 (SE 0,00)		*0 (0,00)	*0 (0,00)	*0 (0,00)	*0 (0,00)
Control de vehículo (0,2 % de MC/1 % de SLS)	31,69 (1,42)	55,75 (7,5)	71,00 (6,96)	11,3 (0,69)	12,69 (0,46)	8,63 (1,51)
Fostamatinib, 30	*23,61 (1,84)	46,15 (6,04)	*48,30 (7,71)	9,80 (8,0)	10,25 (0,94)	8,90 (0,97)
Compuesto 1, 2,5	*22,76 (2,33)	49,25 (8,51)	*41,35 (8,37)	7,70 (1,03)	8,14 (1,05)	6,83 (1,19)
Compuesto 1, 5	*11,84 (2,48)	34,00 (7,59)	*13,35 (6,03)	*3,27 (0,88)	*3,64 (1,08)	*2,53 (0,74)
Compuesto 1,10	*3,34 (1,42)	*11,75 (5,47)	*1,60 (1,60)	*0,75 (0,42)	*0,79 (0,50)	*0,68 (0,57)

*p < 0,05 ensayo ANOVA o Kruskal-Wallis con respecto a Vehículo

Ejemplo 18. Compuesto 1 en modelo de IBD de ratón

- 5 El inhibidor de PI3Ky, el Compuesto 1, se sometió a ensayo en un modelo de colitis inducida por CD40 para determinar su efecto en el transcurso de la enfermedad. El modelo CD40 de IBD se induce por inyección de un anticuerpo monoclonal anti-CD40 (agonista, es decir, anticuerpo activamente con respecto a anticuerpo neutralizante) en ratones con déficit de linfocitos T y B (ratones Rag 1-/-) para inducir inflamación tanto sistémica como intestinal que conduce a colitis y enfermedad por debilitamiento a través de la ruta inmunitaria innata. (Véase, por ejemplo, Immunity 25, 309-318, agosto de 2006). En resumen, a los ratones con desactivación genética Rag1 se les inyectó IP el anticuerpo monoclonal anti-CD40, FGK45. Comenzando el Día 0, los ratones se trataron con PBS, vehículo o Compuesto 1 a 5 mg/kg b.i.d. o 10 mg/kg b.i.d. El Compuesto 1 se administró por IP durante 7 días en un régimen de dosificación b.i.d. de 10/14 horas. El Compuesto 1 se formuló en un 5 % de NMP/15 % de PEG-400/80 % en una solución al 0,5 % de HPMC-E50 en agua. Al finalizar el estudio, se recogieron muestras de suero y colon a las 2 horas después de la última dosis para análisis de concentración de fármaco. Los pesos corporales se midieron diariamente durante el estudio. Las concentraciones del Compuesto 1 se analizaron en las muestras de plasma recogidas 2 horas después de la dosis final al finalizar el estudio. Las concentraciones se determinaron usando un método de cromatografía líquida de alto rendimiento/espectrometría de masas en tandem (HPLC/MS/MS).
- 10 20 Los ratones inyectados con anticuerpo monoclonal anti-CD40 y tratados con vehículo o PBS presentaban una pérdida de peso corporal (medida como porcentaje de cambio a partir del valor inicial) que comenzó el día 1 y tuvo un máximo el día 3-4 antes de la recuperación hacia el valor inicial. Como se muestra en la Figura 4, la pérdida de peso corporal inducida por la enfermedad era de un 17,2 % y de un 17 % los días 3 y 4, respectivamente, en el grupo tratado con PBS y de un 12,8 % y un 12,6 % los días 3 y 4, respectivamente, en el grupo tratado con vehículo. La Figura 4 también muestra que la pérdida de peso corporal estaba inhibida de forma significativa en ratones tratados con el Compuesto 1 a 5 mg/kg b.i.d. (*p < 0,05 d3, **p < 0,01 d4) o 10 mg/kg b.i.d. (**p < 0,001 d3-4) en comparación con controles de vehículo.

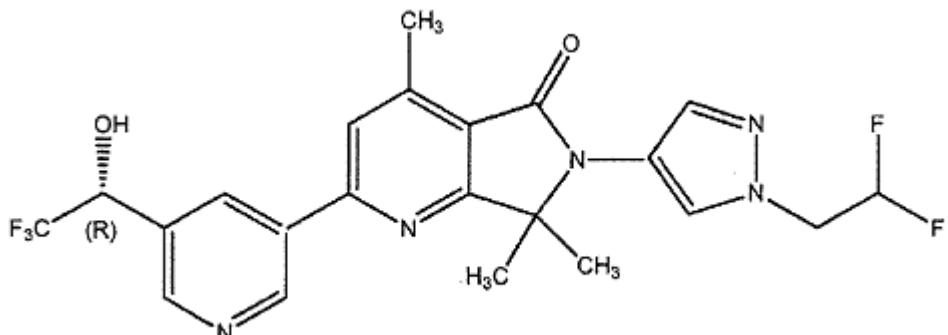
ES 2 687 593 T3

Tabla 14 Concentraciones en Tejido de Compuesto **1** en el Modelo de IBD inducido con CD40

Tratamiento, mg/kg b.i.d.	Concentración de Fármaco en Tejido 2 h	Colon:Plasma
	Plasma (ng/ml)	Colon (ng/mg)
Compuesto 1, 5	4020 ± 4520	6110 ± 6350
Compuesto 1, 10	6220 ± 6190	7480 ± 9700

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 10 2. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 y un excipiente, adyuvante, o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 3. El compuesto o sal del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica del mismo para uso en el tratamiento o disminución de la gravedad de una enfermedad o afección seleccionada entre una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria seleccionada entre asma, dermatitis atópica, rinitis, enfermedades alérgicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), shock séptico, fibrosis pulmonar idiopática, apoplejía, quemaduras, enfermedades de las articulaciones, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, aterosclerosis, pancreatitis aguda, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, y enfermedad de Graves.
- 20 4. El compuesto, sal del mismo o la composición farmacéutica del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicha enfermedad o trastorno es artritis reumatoide.
- 25 5. Un método para inhibir la actividad de PI3K-gamma quinasa en una muestra biológica que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con el compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una composición que comprende dicho compuesto.
- 30 6. Un método para inhibir de forma selectiva una isoforma PI3K-gamma con respecto a al menos otra isoforma de PI3K que comprende poner en contacto una muestra biológica con un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o una composición que comprende dicho compuesto.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la al menos otra isoforma de PI3K se selecciona entre el grupo que consiste en PI3K-alfa, PI3K-beta, PI3K-delta y combinaciones de las mismas.

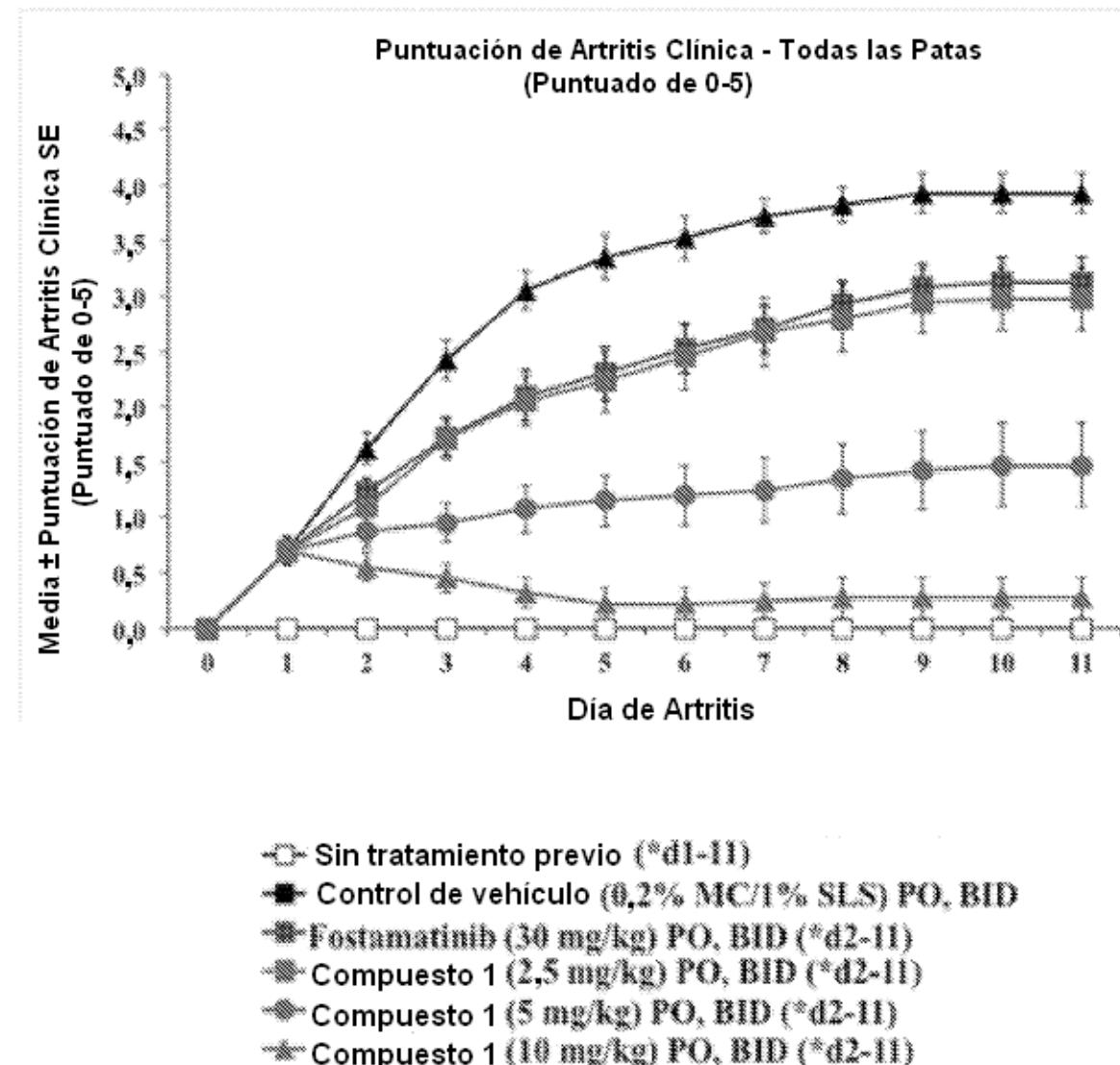
Figura 1

Figura 2

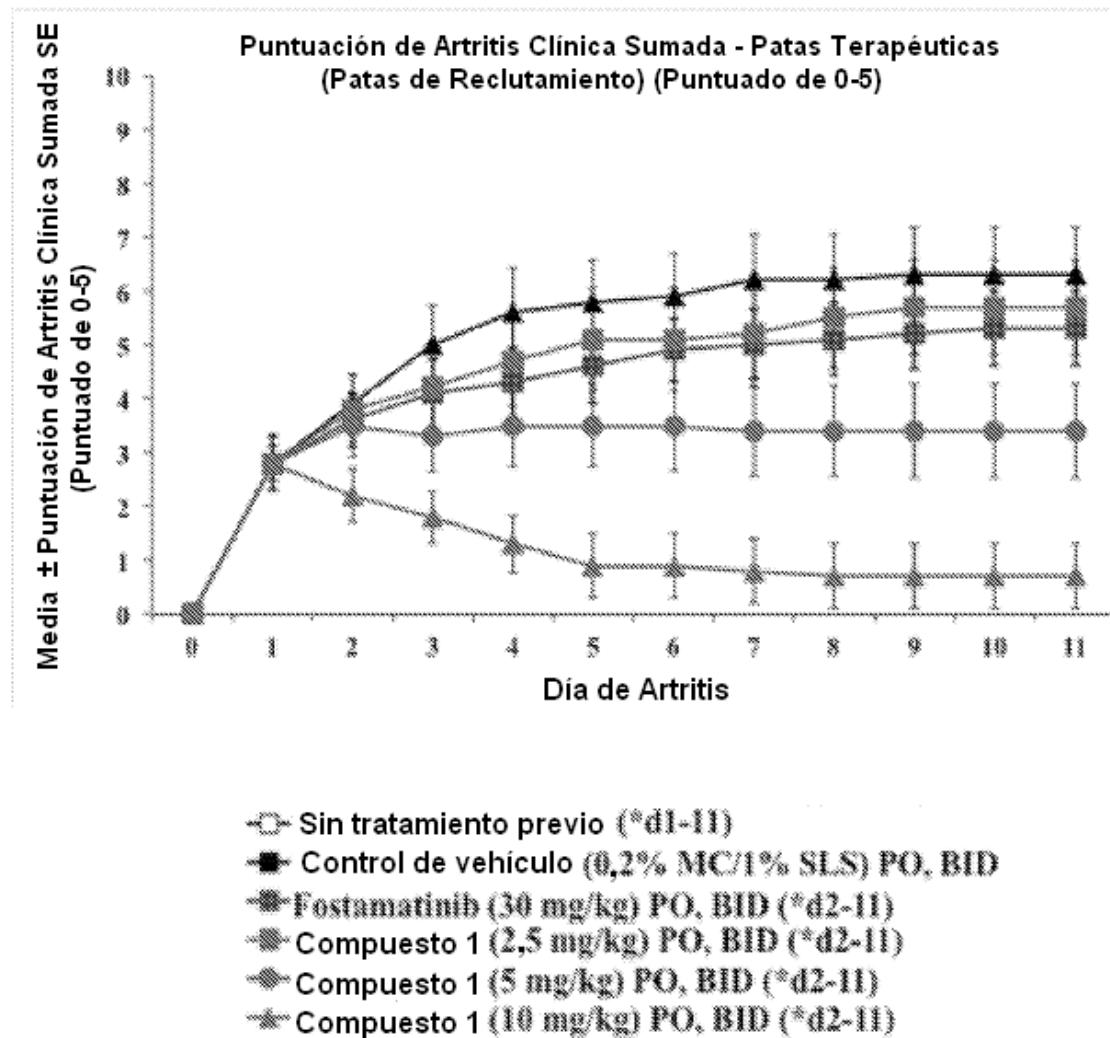


Figura 3

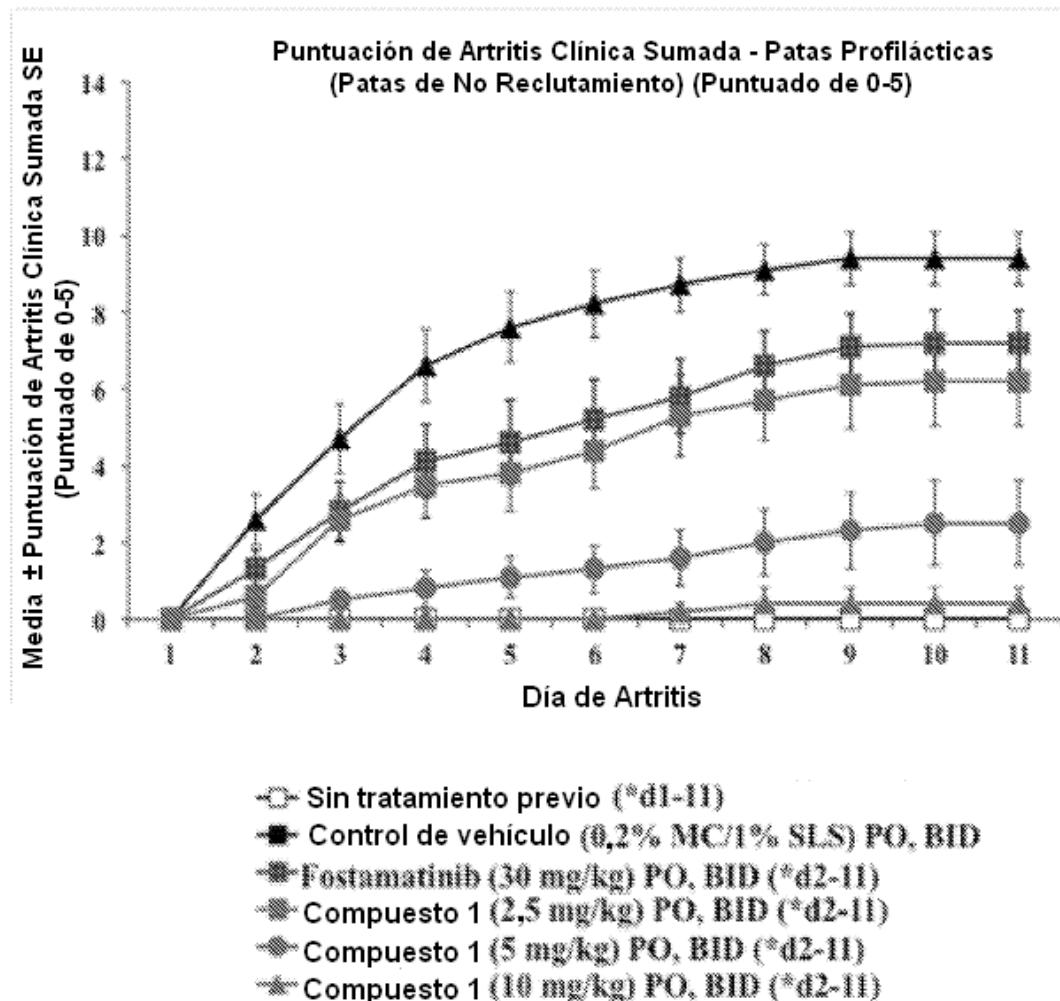
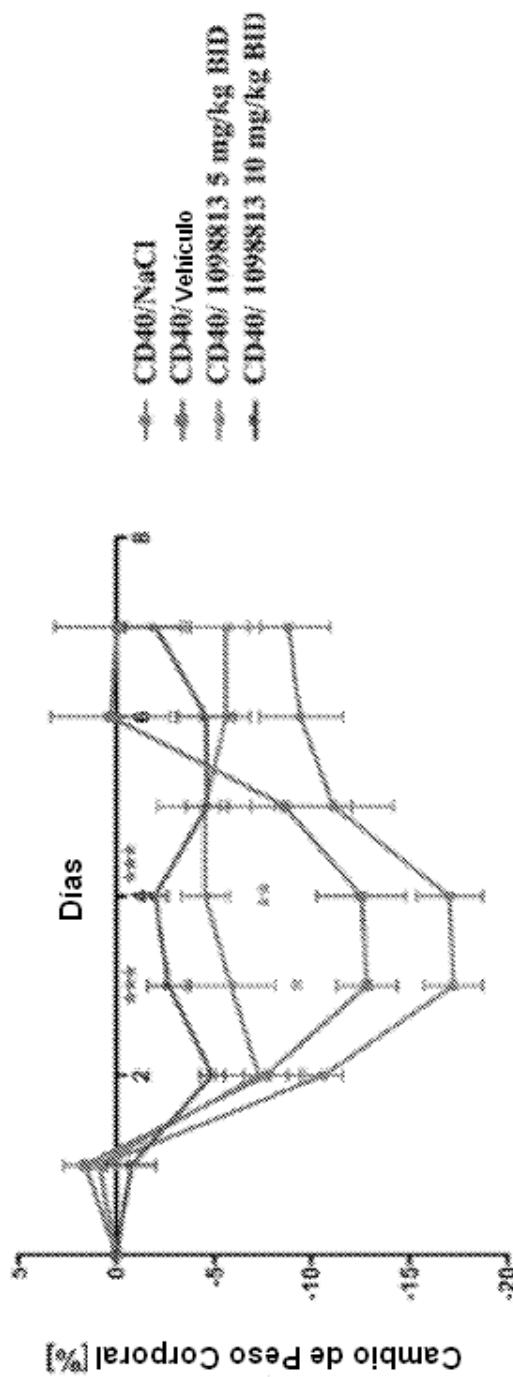


Figura 4

VRT-1098813 Disminuía la Pérdida de Peso Corporal en Modelo de Colitis Inducida por CD40



Tratamiento (mg/kg)	Concentración de Fármaco en Tejido 2 h		Colon Paroxismo (%)
	Plasma (ng/ml)	Colon (ng/mg)	
VRT-1098813, 5	4885 ± 1584	8848 ± 4307	198
VRT-1098813, 10	7700 ± 2317	16025 ± 2255	2

Tratamiento (24 h)	AUC (24 h) ug*h/ml		G
	Colon	Plasma	
Vehículo	103.0 ± 6.10 (4)	9	10
VRT-1098813, 10	88	168	168

- * Picos de pérdida de PC inducida por enfermedad los días 3 y 4, antes de recuperación
- * Tanto 5 como 10 mg/kg BID, los tratamientos IP reducían de forma significativa la pérdida de PC los días 3 y 4

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ANOVA con respecto a Control de Vehículo y grupo de tratamiento