

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 843 522**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2016** **PCT/US2016/019741**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2016** **WO16138363**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2016** **E 16718921 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020** **EP 3262046**

54 Título: **Sales del inhibidor de PI3K y procesos para su preparación**

30 Prioridad:

27.02.2015 US 201562121697 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2021

73 Titular/es:

INCYTE CORPORATION (100.0%)
1801 Augustine Cut-Off
Wilmington, DE 19803, US

72 Inventor/es:

QIAO, LEI;
WENG, LINGKAI;
SHI, CHONGSHENG ERIC;
MELONI, DAVID;
LIN, QIYAN;
XIA, MICHAEL;
SHARIEF, VAQAR;
FRIETZE, WILLIAM;
JIA, ZHONGJIANG;
PAN, YONGCHUN;
LIU, PINGLI;
YUE, TAI-YUEN y
ZHOU, JIACHENG

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 843 522 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

Sales del inhibidor de PI3K y procesos para su preparación

5 CAMPO TÉCNICO

La presente solicitud proporciona un proceso para preparar (*R*)-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona, que es útil como inhibidor de la fosfoinosítido 3-quinasa-delta (PI3K δ), así como una forma de sal y productos intermedios relacionados con la misma.

ANTECEDENTES

Las fosfoinosítido 3-quinasas (PI3K) pertenecen a una familia grande de quinasas señalizadoras de lípidos que fosforilan fosfoinosítidos en la posición D3 del anillo de inositol (Cantley, Science, 2002, 296(5573): 1655-7). Las PI3K se dividen en tres clases (clase I, II y III) de acuerdo con su estructura, regulación y especificidad de sustrato. Las PI3K de clase I, que incluyen PI3K α , PI3K β , PI3K γ y PI3K δ , son una familia de quinasas de lípidos y proteínas de especificidad dual que catalizan la fosforilación de fosfatidilinosito-4,5-bisfosfato (PIP₂) dando lugar a fosfatidilinosito-3,4,5-trisfosfato (PIP₃). El PIP₃ funciona como un segundo mensajero que controla una serie de procesos celulares, incluyendo el crecimiento, la supervivencia, la adhesión y la migración. Las cuatro isoformas de PI3K de clase I existen como heterodímeros compuestos por una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora estrechamente asociada que controla su expresión, activación y localización subcelular. PI3K α , PI3K β y PI3K δ se asocian con una subunidad reguladora conocida como p85 y son activados por factores de crecimiento y citoquinas a través de un mecanismo dependiente de tirosinas quinasas (Jiménez, et al., J Biol Chem., 2002, 277(44): 41556-62) mientras que PI3K γ se asocia con dos subunidades reguladoras (p101 y p84) y su activación es impulsada por la activación de receptores acoplados a proteína G (Brock, et al., J Cell Biol., 2003, 160(1):89-99). PI3K α y PI3K β se expresan ubicuamente. Por el contrario, PI3K γ y PI3K δ se expresan predominantemente en leucocitos (Vanhaesebroeck, et al., Trends Biochem Sci., 2005, 30(4):194-204).

La distribución tisular diferencial de las isoformas de PI3K influye en sus distintas funciones biológicas. La ablación genética de PI3K α o PI3K β da como resultado la letalidad embrionaria, lo que indica que PI3K α y PI3K β tienen funciones esenciales y no redundantes, por lo menos durante el desarrollo (Vanhaesebroeck, et al., 2005). Por el contrario, los ratones que carecen de PI3K γ y PI3K δ son viables, fértiles y tienen una duración de vida normal, aunque muestran un sistema inmunológico alterado. La deficiencia de PI3K γ lleva a un reclutamiento deteriorado de macrófagos y neutrófilos a los sitios de inflamación así como a la activación de células T deteriorada (Sasaki, et al., Science, 2000, 287(5455):1040-6). Los ratones mutantes en PI3K δ tienen defectos específicos en la señalización de las células B que llevan a un desarrollo deteriorado de las células B y respuestas de anticuerpos reducidas después de la estimulación del antígeno (Clayton, et al., J Exp Med. 2002, 196(6):753-63; Jou, et al., Mol Cell Biol. 2002, 22(24):8580-91; Okkenhaug et al., Science, 2002, 297(5583):1031-4).

Los fenotipos de los ratones mutantes en PI3K γ y PI3K δ sugieren que estas enzimas pueden desempeñar una función en la inflamación y otras enfermedades de base inmunitaria y esto se confirma en modelos preclínicos. Los ratones mutantes en PI3K γ están ampliamente protegidos de la enfermedad de ratón de artritis reumatoide (AR) y asma (Camps, et al., Nat Med. 2005, 11(9):936-43; Thomas, et al., Eur. J Immunol. 2005, 35(4):1283-91). Además, se demostró que el tratamiento de ratones de tipo salvaje con un inhibidor selectivo de PI3K γ reduce la glomerulonefritis y prolonga la supervivencia en el modelo MRL-lpr de nefritis lúpica sistémica (SEL) y suprime la inflamación y el daño articular en modelos de AR (Barber, et al., Nat Med. 2005, 11(9):933-5; Camps, et al., 2005). De manera similar, se ha demostrado que tanto los ratones mutantes en PI3K δ como los ratones de tipo salvaje tratados con un inhibidor selectivo de PI3K δ han atenuado la inflamación alérgica de las vías respiratorias y la hipersensibilidad en un modelo de asma de ratón (Ali, et al., Nature. 2004, 431(7011):1007-11; Lee, et al., FASEB J. 2006, 20(3):455-65) y han atenuado la enfermedad en un modelo de AR (Randis, et al., Eur. J. Immunol., 2008, 38(5):1215-24).

Se ha demostrado que la proliferación de células B desempeña un papel importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes inflamatorias (Puri, Frontiers in Immunology (2012), 3(256), 1-16; Walsh, Kidney International (2007) 72, 676-682). Por ejemplo, las células B respaldan la autorreactividad de las células T, un componente importante de las enfermedades autoinmunes inflamatorias. Una vez activadas y maduras, las células B pueden transitar hacia los sitios de inflamación y reclutan células inflamatorias o se diferencian en plasmablastos. Por tanto, la actividad de las células B puede verse afectada dirigiéndose a citoquinas estimuladoras de células B, receptores de superficie de células B, o mediante el agotamiento de las células B. Se ha demostrado que el rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón/humano de IgG1k dirigido contra el receptor CD20 de superficie de células B, agota las células B CD20+. Se ha demostrado que el uso de rituximab tiene eficacia en el tratamiento de púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune o vasculitis. Por ejemplo, el tratamiento con rituximab dio como resultado la remisión de la enfermedad en pacientes que padecían vasculitis sistémica asociada a anticuerpos del citoplasma antineutrófilos (ANCA) (AASV) con agotamiento demostrado de

células B periféricas (Walsh, 2007; Lovric, Nephrol Dial Transplant (2009) 24:179-185). De manera similar, se ha informado de una respuesta completa de un tercio a dos tercios de los pacientes que tenían vasculitis por crioglobulinemia mixta después del tratamiento con rituximab, incluyendo los pacientes que presentaban una forma grave de vasculitis que era resistente o intolerante a otros tratamientos (Cacoub, Ann Rheum Dis 2008;67: 283-287). De manera similar, se ha demostrado que el rituximab tiene eficacia en el tratamiento de pacientes con púrpura trombocitopénica idiopática (o púrpura trombocitopénica inmune) (Garvey, British Journal of Hematology, (2008) 141, 149-169; Godeau, Blood (2008), 112(4), 999-1004; Medeo, European Journal of Hematology, (2008) 81, 165-169) y anemia hemolítica autoinmune (Garvey, British Journal of Hematology, (2008) 141, 149-169).

La señalización de PI3K δ se ha relacionado con la supervivencia, migración y activación de células B (Puri, Frontiers in Immunology, 2012, 3(256), 1-16, en las páginas 1-5; y Clayton, J Exp Med, 2002, 196(6):753-63). Por ejemplo, se requiere PI3K δ para la activación de células B dependiente de antígeno impulsada por el receptor de células B. Al bloquear la adhesión, supervivencia, activación y proliferación de las células B, la inhibición de PI3K δ puede deteriorar la capacidad de las células B para activar las células T, previniendo su activación y reduciendo la secreción de autoanticuerpos y citoquinas proinflamatorias. Por tanto, por su capacidad para inhibir la activación de las células B, se esperaría que los inhibidores de PI3K δ trataran enfermedades mediadas por células B que se podrían tratar mediante métodos similares, como el agotamiento de las células B por rituximab. En efecto, Se ha demostrado que los inhibidores de PI3K δ son modelos de ratón útiles de varias enfermedades autoinmunes que también pueden tratarse con rituximab, como la artritis (Puri (2012)). Además, las células B de tipo innato, que están vinculadas a la autoinmunidad son sensibles a la actividad de PI3K δ , ya que las células MZ y B-1 están casi ausentes en ratones que carecen del gen p110 δ (Puri (2012)). Los inhibidores de PI3K δ pueden reducir el tránsito y la activación de células MZ y B-1, que están implicadas en enfermedades autoinmunes.

Además de su función potencial en las enfermedades inflamatorias, las cuatro isoformas de PI3K de clase I pueden desempeñar un papel en el cáncer. El gen que codifica p110 α está mutado con frecuencia en cánceres comunes, incluyendo los de mama, próstata, colon y endometrio (Samuels, et al., Science, 2004, 304(5670):554; Samuels, et al., Curr Opin Oncol. 2006, 18(1):77-82). El ochenta por ciento de estas mutaciones están representadas por una de las tres sustituciones de aminoácidos en los dominios helicoidales o de quinasas de la enzima y llevan a una regulación por incremento significativa de la actividad de quinasas que da como resultado una transformación oncogénica en cultivos celulares y en modelos animales (Kang, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2005, 102(3):802-7; Bader et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103(5):1475-9). No se han identificado tales mutaciones en las otras isoformas de PI3K, aunque hay evidencias de que pueden contribuir al desarrollo y progresión de enfermedades malignas. Se observa una sobreexpresión consistente de PI3K δ en la leucemia mieloblástica aguda (Sujobert, et al., Blood, 2005, 106(3):1063-6) y los inhibidores de PI3K δ pueden evitar el crecimiento de células leucémicas (Billottet et al., Oncogene. 2006, 25(50):6648-59). Se observa una expresión elevada de PI3K γ en la leucemia mieloide crónica (Hickey et al., J Biol. Chem. 2006, 281(5):2441-50). También se han observado alteraciones en la expresión de PI3K β , PI3K γ y PI3K δ en cánceres de cerebro, colon y vejiga (Benistant, et al., Oncogene, 2000, 19(44):5083-90; Mizoguchi et al., Brain Pathol. 2004, 14(4):372-7; Knobbe et al., Neuropathol Appl Neurobiol. 2005, 31(5):486-90). Además, se ha demostrado que todas estas isoformas son oncogénicas en cultivos celulares (Kang, et al., 2006).

La US2014/249132 describe derivados de pirazolopirimidina para el tratamiento de trastornos relacionados con PI3K δ .

Por estas razones, hay una necesidad de desarrollar nuevos inhibidores de PI3K que puedan usarse en trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes y cáncer. Esta invención está dirigida a esta y otras necesidades.

SUMARIO

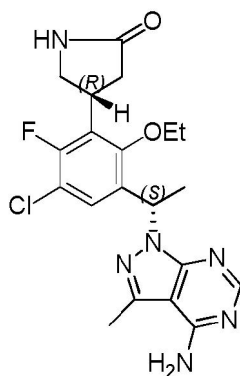
La presente invención proporciona una sal que es sal de ácido clorhídrico de (*R*)-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona, que es cristalina.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende la sal de ácido clorhídrico de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además un método para inhibir la actividad de una quinasa de PI3K δ , in vitro, que comprende poner en contacto la quinasa con la sal de ácido clorhídrico de la invención.

La presente invención también proporciona una sal de ácido clorhídrico de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se define en las reivindicaciones.

La presente invención también proporciona un proceso para preparar la sal de ácido clorhídrico de la invención, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I:

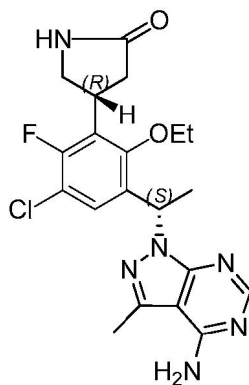


I

con ácido clorhídrico para formar dicha sal.

La presente solicitud proporciona además el uso de la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I para la fabricación de un medicamento para su uso en cualquiera de los métodos descritos en la presente.

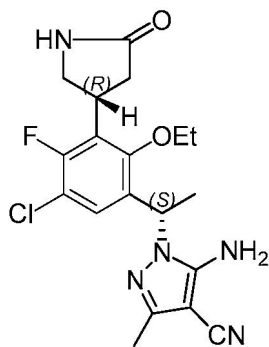
La presente solicitud también proporciona un proceso para preparar la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I:



I

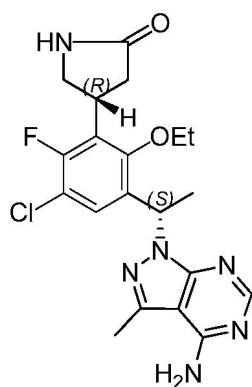
con ácido clorhídrico para formar dicha sal.

La presente solicitud proporciona adicionalmente un proceso para preparar un compuesto de Fórmula I, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XVI**:



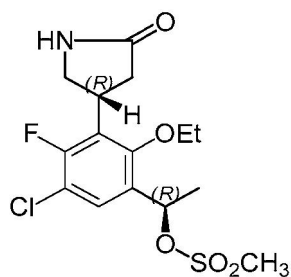
XVI

con acetato de formamidina para formar dicho compuesto de Fórmula I:



I.

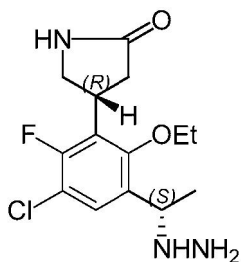
La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XIV**:



XIV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

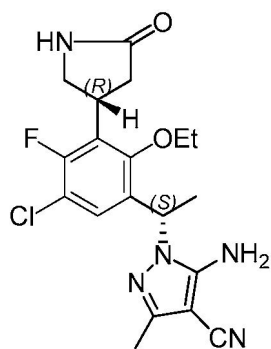
La presente solicitud también proporciona un compuesto de Fórmula **XV**:



XV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

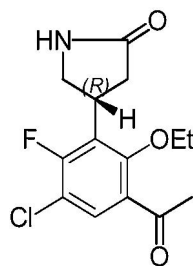
La presente solicitud proporciona adicionalmente un compuesto de Fórmula **XVI**:



XVI

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

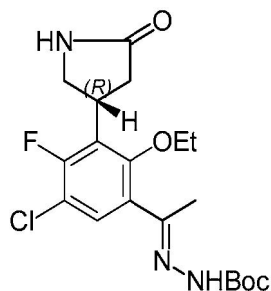
La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XIX**:



XIX

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

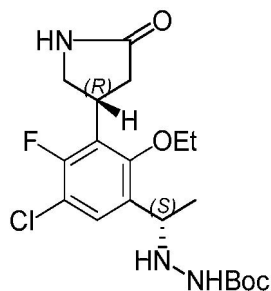
La presente solicitud también proporciona un compuesto de Fórmula **XX**:



XX

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente solicitud también proporciona un compuesto de Fórmula **XXI**:



XXI

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 muestra un termograma DSC representativo de la sal del Ejemplo 3.

FIG. 2 muestra datos de TGA representativos de la sal del Ejemplo 3.

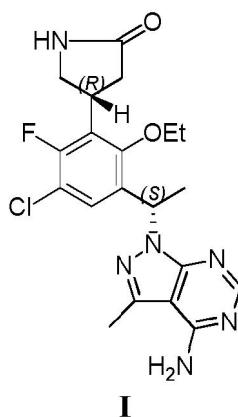
FIG. 3 muestra un patrón de XRPD representativo de la sal del Ejemplo 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Compuestos y sales

La presente invención proporciona una sal que es sal de ácido clorhídrico de *(R)*-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona, que es cristalina.

También se describen en la presente procesos que pueden usarse para preparar un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es útil como inhibidor de PI3Kδ, donde Et es etilo. También se describen productos intermedios relacionados con el mismo que pueden usarse para preparar un compuesto de Fórmula I y sales del mismo.

En algunas realizaciones, la sal es una proporción estequiométrica 1:1 de *(R)*-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona con ácido clorhídrico.

Diferentes formas de la misma sustancia tienen diferentes propiedades intensivas relacionadas, por ejemplo, con la higroscopicidad, solubilidad, estabilidad y similares. Las formas con altos puntos de fusión a menudo tienen una buena estabilidad termodinámica, lo que es ventajoso para prolongar la vida útil de las formulaciones de fármacos que contienen la forma sólida. Las formas con puntos de fusión más bajos a menudo son menos estables termodinámicamente, pero son ventajosas ya que tienen una mayor solubilidad en agua, lo que se traduce en una mayor biodisponibilidad del fármaco. Las formas que son débilmente higroscópicas son deseables por su estabilidad al calor y la humedad y son resistentes a la degradación durante un almacenamiento prolongado.

La sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I proporcionada en la presente es cristalina. Como se usa en la presente, "cristalino" o "forma cristalina" se refiere a una determinada configuración de entramado de una sustancia cristalina. Las diferentes formas cristalinas de la misma sustancia suelen tener diferentes entramados cristalinos (por ejemplo, celdas unitarias) que se atribuyen a diferentes propiedades físicas que son características de cada una de las formas cristalinas. En algunos casos, diferentes configuraciones de entramado tienen diferente contenido de agua o solvente.

Las diferentes formas de sal pueden identificarse mediante métodos de caracterización de estado sólido, como por difracción de rayos X en polvo (XRPD). Otros métodos de caracterización, como calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis termogravimétrico (TGA), sorción dinámica de vapor (DVS) y similares, ayudan adicionalmente a identificar la forma, así como a determinar la estabilidad y el contenido de agua/solvente.

Un patrón XRPD de reflexiones (picos) se considera generalmente una huella de una forma cristalina particular. Es bien sabido que las intensidades relativas de los picos de XRPD pueden variar ampliamente dependiendo, entre otras cosas, de la técnica de preparación de la muestra, la distribución del tamaño del cristal, los varios filtros usados, el procedimiento de montaje de la muestra, y el instrumento particular empleado. En algunos

casos, pueden observarse nuevos picos o pueden desaparecer picos existentes, dependiendo del tipo de instrumento o la configuración. Como se usa en la presente, el término "pico" se refiere a una reflexión que tiene una altura/intensidad relativa de por lo menos aproximadamente el 4% de la altura/intensidad del pico máxima. Además, la variación del instrumento y otros factores pueden afectar los valores 2-theta. Por tanto, las asignaciones de picos, como las que se informan en la presente, pueden variar en más o menos aproximadamente 0,2° (2-theta), y el término "sustancialmente" y "aproximadamente" como se usan en el contexto de XRPD en la presente se entiende que abarca las variaciones mencionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene por lo menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de aproximadamente 11,3°, aproximadamente 16,4°, aproximadamente 21,0°, aproximadamente 23,0°, aproximadamente 28,1°, aproximadamente 31,2° y aproximadamente 32,8°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene por lo menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 11,3°, aproximadamente 16,4°, aproximadamente 21,0°, aproximadamente 23,0°, aproximadamente 28,1°, aproximadamente 31,2° y aproximadamente 32,8°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene por lo menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 11,3°, aproximadamente 16,4°, aproximadamente 21,0°, aproximadamente 23,0°, aproximadamente 28,1°, aproximadamente 31,2° y aproximadamente 32,8°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene por lo menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 11,3°, aproximadamente 16,4°, aproximadamente 21,0°, aproximadamente 23,0°, aproximadamente 28,1°, aproximadamente 31,2° y aproximadamente 32,8°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene por lo menos cinco picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de aproximadamente 11,3°, aproximadamente 16,4°, aproximadamente 21,0°, aproximadamente 23,0°, aproximadamente 28,1°, aproximadamente 31,2° y aproximadamente 32,8°. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene un perfil de XRPD sustancialmente como se muestra en la Figura 3.

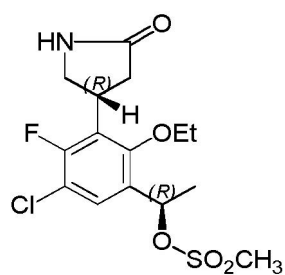
De la misma manera, las lecturas de temperatura en relación con DSC, TGA u otros experimentos térmicos pueden variar aproximadamente en $\pm 3^\circ \text{C}$ dependiendo del instrumento, las configuraciones particulares, preparación de la muestra, etc. Por consiguiente, una forma cristalina informada en la presente tiene un termograma de DSC "sustancialmente" como se muestra en cualquiera de las figuras o se entiende que el término "aproximadamente" acomoda tal variación. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a aproximadamente 207° C. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene un termograma de DSC sustancialmente como se muestra en la Figura 1. En algunas realizaciones, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I tiene un termograma de TGA sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

En algunas realizaciones, las sales y compuestos descritos en la presente (por ejemplo, el compuesto de Fórmula I o la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I) están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se entiende que la sal o el compuesto está por lo menos parcial o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en las sales descritas en la presente. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen por lo menos aproximadamente un 50%, por lo menos aproximadamente un 60%, por lo menos aproximadamente un 70%, por lo menos aproximadamente un 80%, por lo menos aproximadamente un 90%, por lo menos aproximadamente un 95%, por lo menos aproximadamente un 97%, o por lo menos aproximadamente un 99% en peso de las sales descritas en la presente, o sal de las mismas. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.

Productos intermedios

La presente solicitud proporciona además productos intermedios que son útiles en la preparación del compuesto de Fórmula I.

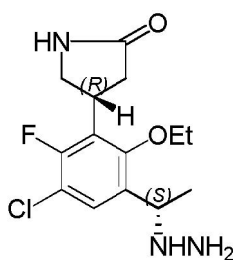
Por consiguiente, la presente solicitud proporciona un compuesto de Fórmula **XIV**:



XIV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

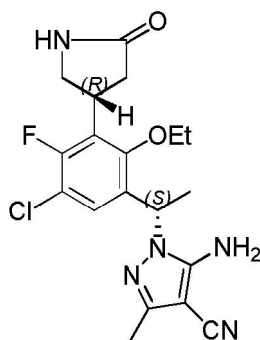
La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XV**:



XV

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

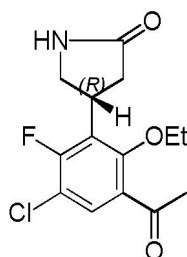
La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XVI**:



XVI

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

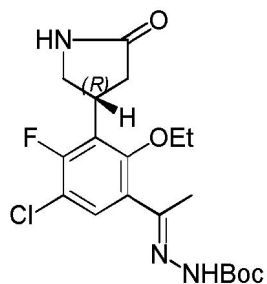
La presente solicitud proporciona además un compuesto de fórmula **XIX**:



XIX

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

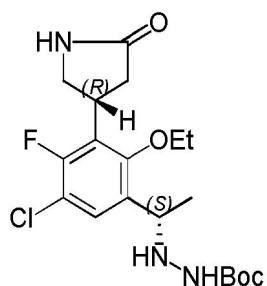
La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XX**:



XX

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente solicitud proporciona además un compuesto de Fórmula **XXI**:

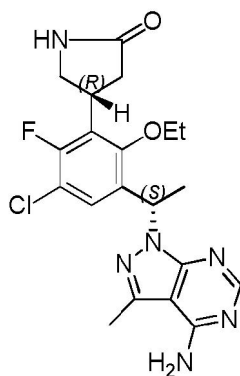


XXI

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

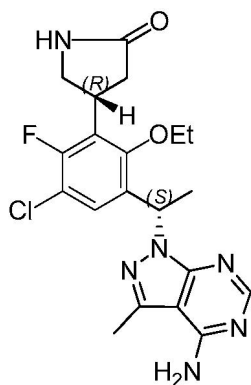
Procesos

La presente invención proporciona además un proceso para preparar una sal de ácido clorhídrico de Fórmula I:



I.

que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I:



I

con ácido clorhídrico para formar dicha sal.

En algunas realizaciones, dicho ácido clorhídrico es ácido clorhídrico acuoso 1 M.

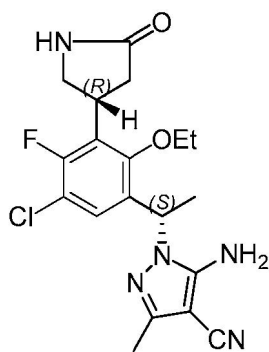
En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7 equivalentes de ácido clorhídrico en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula I.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 45° C a aproximadamente 55° C.

En algunas realizaciones, el proceso comprende:

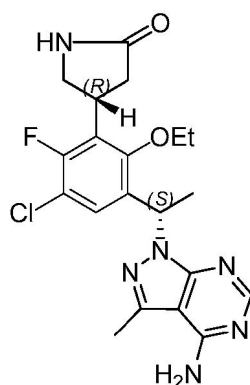
añadir ácido clorhídrico al compuesto de Fórmula I a temperatura ambiente para formar una lechada; calentar dicha lechada a una temperatura de aproximadamente 45° C a aproximadamente 55° C para formar una solución; y enfriar la solución a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 5° C para cristalizar dicha sal.

En algunas realizaciones, el proceso comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XVI**:



XVI

con acetato de formamidina para formar un compuesto de Fórmula I:



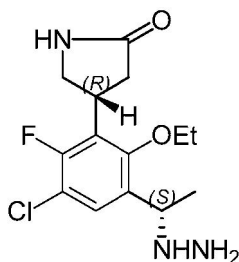
I.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XVI** con acetato de formamidina se realiza en un componente solvente que comprende 1,2-etanodiol.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XVI** con acetato de formamidina se realiza a una temperatura de aproximadamente 100°C a aproximadamente 105°C.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 equivalentes de acetato de formamidina basado en 1 equivalente del compuesto de Fórmula **XVI**.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar el compuesto de Fórmula **XVI** mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XV**:



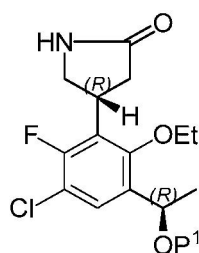
XV

con (1-etoxietilideno)malononitrilo en presencia de una amina terciaria.

En algunas realizaciones, dicha amina terciaria es N-metilpirrolidinona.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XV** con (1-etoxietilideno)malononitrilo se realiza aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar el compuesto de Fórmula **XV** mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XIV-a**:



XIV-a

con hidrazina en presencia de una amina terciaria, en donde P¹ es alquilsulfonilo C₁₋₆.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XIV-a** con hidrazina se realiza a una temperatura de aproximadamente 35° C a aproximadamente 60° C.

En algunas realizaciones, P¹ es un grupo metanosulfonilo.

CCOC1=C(C(O)C2C(=O)NCC2)C(Cl)=C(F)C1

con haluro de alquilsulfonilo C₁₋₆ en presencia de una amina terciaria.

En algunas realizaciones, dicha amina terciaria es N,N-diisopropiletilamina.

En algunas realizaciones, dicha reacción de dicho compuesto de Fórmula **XIII** con haluro de alquilsulfonilo C_{1-6} se realiza a una temperatura de aproximadamente $-10^{\circ}C$ a aproximadamente $5^{\circ}C$.

En algunas realizaciones, los pasos de: (i) hacer reaccionar dicho compuesto de Fórmula **XIII** con haluro de alquilsulfonilo C₁₋₆; (ii) hacer reaccionar dicho compuesto de Fórmula **XIV-a** con hidrazina en presencia de una amina terciaria para formar un compuesto de Fórmula **XV**; y (iii) hacer reaccionar dicho compuesto de Fórmula **XV** con acetato de formamida para formar un compuesto de Fórmula **XVI** se lleva a cabo en el mismo recipiente sin aislamiento del compuesto de Fórmula **XIV-a** o el compuesto de Fórmula **XV**.

con (1-etoxietiliden)malononitrilo en presencia de una amina terciaria, en donde TsOH es ácido β -toluenosulfónico.

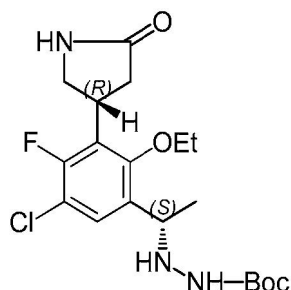
13

En algunas realizaciones, dicha reacción de una sal de Fórmula **XV-a** con (1-etoxietiliden)malononitrilo se realiza aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,6 equivalentes de (1-etoxietiliden)malononitrilo en base a 1 equivalente de la sal de Fórmula **XV-a**.

En algunas realizaciones, dicha reacción de la sal de Fórmula **XV-a** con (1-etoxietiliden)malononitrilo se realiza en un componente solvente que comprende etanol.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar la sal de Fórmula **XV-a** mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XXI**:



XXI

con ácido p-toluenosulfónico, en donde Boc es terc-butoxicarbonilo.

En algunas realizaciones, dicho ácido p-toluenosulfónico es ácido p-toluenosulfónico monohidrato.

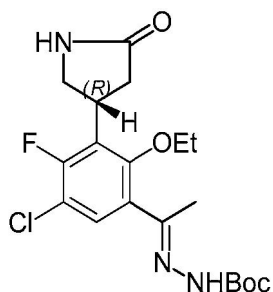
En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,6 equivalentes de ácido p-toluenosulfónico en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **XXI**.

En algunas realizaciones, dicha reacción de dicho compuesto de fórmula **XXI** con ácido p-toluenosulfónico se realiza a una temperatura de aproximadamente 45°C a aproximadamente 65°C.

En algunas realizaciones, la reacción de dicho compuesto de Fórmula **XXI** con ácido p-toluenosulfónico se realiza en un componente solvente que comprende etanol.

En algunas realizaciones, los pasos de: (i) hacer reaccionar dicho compuesto de Fórmula **XXI** con ácido p-toluenosulfónico para formar una sal de Fórmula **XV-a**; y (ii) hacer reaccionar dicha sal de Fórmula **XV-a** con (1-etoxietiliden)malononitrilo se realizan en el mismo recipiente sin aislamiento de la sal de Fórmula **XV-a**.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar el compuesto de Fórmula **XXI** mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XX**:



XX

con hidrógeno gaseoso en presencia de uno o más catalizadores de hidrogenación seleccionados independientemente, en donde el Boc es terc-butoxicarbonilo.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de fórmula **XX** con gas de hidrógeno se realiza en presencia de dos catalizadores de hidrogenación seleccionados independientemente.

En algunas realizaciones, un catalizador de hidrogenación es bis(1,5-ciclooctadieno)rodio(I)tetrafluoroborato y el otro es (R)-(-)-1-[(S)-2-[bis(4-trifluorometilfenil)fosfina]ferrocenil]etil-di-t-butilfosfina.

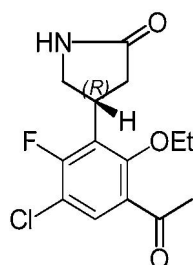
En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 13,5 a aproximadamente 14,5 equivalentes de bis(1,5-ciclooctadieno)rodio(I)tetrafluoroborato en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **XX**.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 12 a aproximadamente 13 equivalentes de (R)-(-)-1-[(S)-2-[bis(4-trifluorometilfenil)fosfina]ferrocenil]etil-di-t-butilfosfina en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **XX**.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de fórmula **XX** con gas de hidrógeno se realiza aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de fórmula **XX** con gas de hidrógeno se realiza en un componente solvente que comprende metanol.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar el compuesto de Fórmula **XX** mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XIX**:



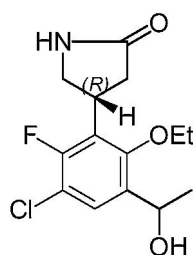
XIX

con carbazato de t-butilo.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XIX** con carbazato de t-butilo se realiza a una temperatura de aproximadamente 60° C a aproximadamente 70° C.

En algunas realizaciones, dicha reacción del compuesto de Fórmula **XIX** con carbazato de t-butilo se realiza en un componente solvente que comprende metanol.

En algunas realizaciones, el proceso comprende además preparar el compuesto de Fórmula **XIX** mediante un proceso que comprende oxidar un compuesto de Fórmula **XIII-a**:



XIII-a

en presencia de un agente oxidante.

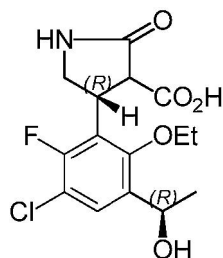
En algunas realizaciones, dicho agente oxidante es peryodinato de Dess-Martin.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,7 equivalentes de dicho agente oxidante en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **XIII-a**.

En algunas realizaciones, dicha oxidación del compuesto de Fórmula **XIII-a** se realiza aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, dicha oxidación del compuesto de Fórmula **XIII-a** se realiza en un componente solvente que comprende diclorometano.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **XIII** se prepara mediante un proceso que comprende calentar un compuesto de Fórmula **XII**:



XII

en presencia de un componente solvente.

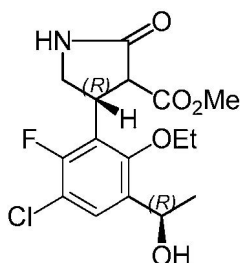
En algunas realizaciones, dicho calentamiento se realiza a una temperatura de aproximadamente 95° C a aproximadamente 105° C.

En algunas realizaciones, dicho componente solvente comprende 1,4-dioxano.

En algunas realizaciones, dicho componente solvente comprende tolueno.

En algunas realizaciones, dicho componente solvente comprende 1,4-dioxano y tolueno.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **XII** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **XI**:



XI

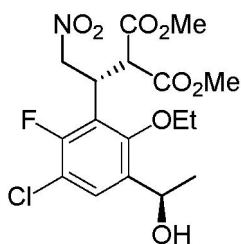
en presencia de una base fuerte.

En algunas realizaciones, dicha base fuerte es hidróxido de sodio.

En algunas realizaciones, dicha base fuerte es hidróxido de sodio acuoso 1 M.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza a aproximadamente la temperatura ambiente.

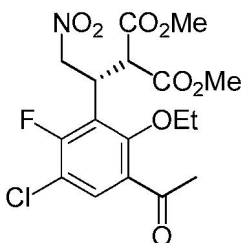
En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **XI** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **X**:

**X**

con gas hidrógeno en presencia de níquel Raney.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 50° C a aproximadamente 70° C.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **X** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **IX**:

**IX**

en presencia de éterato de trifluoruro de boro, catalizador de (3aS)-1-metil-3,3-difeniltetrahydro-3H-pirrol[1,2-c][1,3,2]oxazaborol ((S)-MeCBS), y un complejo de borano.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,07 equivalentes de éterato de trifluoruro de boro en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **IX**.

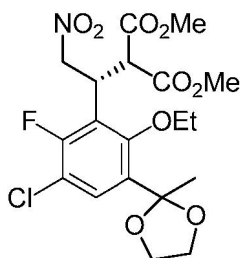
En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,15 equivalentes de catalizador (3aS) -1-metil- 3,3-difeniltetrahydro-3H-pirrol[1,2-c][1,3,2]oxazaborol ((S)-MeCBS) en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **IX**.

En algunas realizaciones, dicho complejo de borano es un complejo de borano-THF 1,0 M en THF.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,1 equivalentes de complejo de borano en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **IX**.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **IX** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **VIII**:

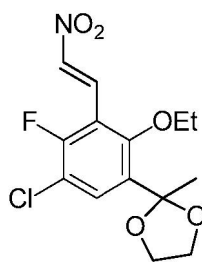
**VIII**

con yodo en presencia de un componente solvente.

En algunas realizaciones, dicho componente solvente comprende acetona.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 1,25 equivalentes de yodo en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula VIII.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula VIII se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VII:



VII

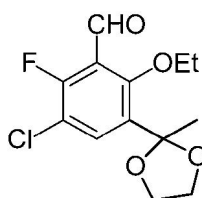
con malonato de dimetilo en presencia de un catalizador.

En algunas realizaciones, dicho catalizador es (1S,2S)-N,N'-dibencilciclohexano-1,2-diamina-dibromoníquel (catalizador de Evans).

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,3 equivalentes de malonato de dimetilo en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula VII.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,03 equivalentes de catalizador de metal de transición en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula VII.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula VII se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula VI:



VI

con nitrometano en presencia de un ácido orgánico para formar una primera mezcla.

En algunas realizaciones, dicho ácido orgánico es ácido acético glacial.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 10,5 equivalentes de nitrometano en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula VI.

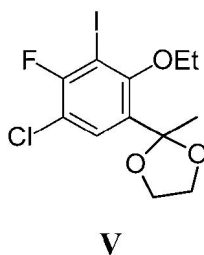
En algunas realizaciones, dicha reacción comprende además añadir una base de amina a dicha primera mezcla para formar una segunda mezcla.

En algunas realizaciones, dicha base de amina es bencilamina.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3 equivalentes de base amina en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula VI.

En algunas realizaciones, dicha segunda mezcla se calienta de aproximadamente 55° C a aproximadamente 65°C.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **VI** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **V**:



con un complejo de haluro de (alquilo C₁₋₄)magnesio para formar una primera mezcla.

En algunas realizaciones, dicho complejo de haluro de (alquilo C₁₋₄)magnesio es un complejo de cloruro de litio cloruro de isopropilmagnesio 1,3 M.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,3 equivalentes de dicho complejo de haluro de (alquilo C₁₋₄)magnesio en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **V**.

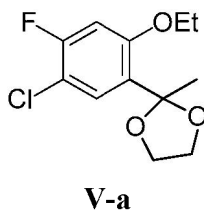
En algunas realizaciones, dicha reacción comprende además añadir N-formilmorfolina a dicha primera mezcla para formar una segunda mezcla.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,2 equivalentes de N-formilmorfolina en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **V**.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente -5°C a aproximadamente 10°C.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **V** se prepara de acuerdo con los procedimientos descritos en la Publicación de Estados Unidos N° 2013-0059835A1.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **VI** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **V-a**:



con N,N-dimetilformamida en presencia de diisopropilamida de litio.

En algunas realizaciones, dicha diisopropilamida de litio se prepara haciendo reaccionar N,N-diisopropilamina en presencia de n-butililitio.

En algunas realizaciones, dicha diisopropilamida de litio se prepara a una temperatura de aproximadamente -75 °C a aproximadamente 5° C.

En algunas realizaciones:

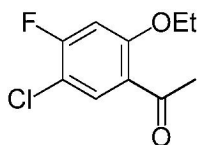
- (ii) dicho compuesto de fórmula **V-a** se hace reaccionar con diisopropilamida de litio para formar una primera mezcla; y
 (ii) se añade N,N-dimetilformamida a dicha primera mezcla para formar una segunda mezcla.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,2 a aproximadamente 1,3 equivalentes de base amina en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula **V-a**.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,4 a aproximadamente 1,6 equivalentes de N,N-dimetilformamida en base a 1 equivalente del compuesto de fórmula **V-a**.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **V-a** se prepara mediante un proceso que

comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **IV-a**:



IV-a

con 1,2-etanodiol en presencia de ácido p-toluenosulfónico.

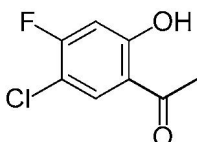
En algunas realizaciones, dicho ácido p-toluenosulfónico es monohidrato de ácido p-toluenosulfónico.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 2,2 a aproximadamente 2,7 equivalentes de 1,2-etanodiol en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **IV-a**.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,1 equivalentes de ácido p-toluenosulfónico en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **IV-a**.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza aproximadamente a reflujo.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **IV-a** se prepara mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula **II**:



II

con $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-X}^1$ en presencia de una base de carbonato de metal alcalino, en donde: X^1 es haluro.

En algunas realizaciones, X^1 es yoduro.

En algunas realizaciones, dicha base de carbonato de metal alcalino es carbonato de potasio.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,1 a aproximadamente 1,3 equivalentes de $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-X}^1$ en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **II**.

En algunas realizaciones, se usan de aproximadamente 1,8 a aproximadamente 2,2 equivalentes de base de carbonato de metal alcalino en base a 1 equivalente del compuesto de Fórmula **II**.

En algunas realizaciones, dicha reacción se realiza a de aproximadamente 55° C a aproximadamente 65° C.

En algunas realizaciones, dicho compuesto de Fórmula **II** se prepara de acuerdo con los procedimientos descritos en la Publicación de Estados Unidos N° 2013-0059835A1.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización (aunque se pretende que las realizaciones se combinen como si estuvieran escritas en forma dependiente múltiple). A la inversa, varias características de la invención que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Las sales y compuestos descritos en la presente pueden ser asimétricos (por ejemplo, tener uno o más estereocentros). Si no se indica estereoquímica, entonces se pretenden todos los estereoisómeros, como enantiómeros y diastereómeros, a menos que se indique lo contrario por la estructura o el nombre. Las sales y compuestos de la presente solicitud que contienen átomos de carbono sustituidos asimétricamente pueden aislarse en formas ópticamente activas o racémicas. En la técnica se conocen métodos sobre cómo preparar formas ópticamente activas a partir de materiales de partida ópticamente inactivos, como por resolución de mezclas racémicas o por síntesis estereoselectiva. Muchos isómeros geométricos de olefinas, enlaces dobles $\text{C}=\text{N}$ y

similares también pueden estar presentes en las sales y compuestos descritos en la presente, y todos estos isómeros estables se contemplan en la presente solicitud. Se describen los isómeros geométricos *cis* y *trans* de las sales y compuestos de la presente solicitud y pueden aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas separadas.

La resolución de mezclas racémicas de sales y compuestos puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los numerosos métodos conocidos en la técnica. Un método de ejemplo incluye la recristalización fraccionada usando un ácido de resolución quiral que es un ácido orgánico formador de sales, ópticamente activo. Los agentes de resolución adecuados para métodos de recristalización fraccionada son, por ejemplo, ácidos ópticamente activos, como las formas D y L del ácido tartárico, ácido diacetiltartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido mandélico, ácido málico, ácido láctico o los varios ácidos canforsulfónicos ópticamente activos como ácido β -canforsulfónico. Otros agentes de resolución adecuados para los métodos de cristalización fraccionada incluyen formas estereoisoméricamente puras de α -metilbencilamina (por ejemplo, formas S y R, o formas diastereoisoméricas puras), 2-fenilglicinol, norefedrina, efedrina, N-metilefedrina, ciclohexiletilamina, 1,2-diaminociclohexano, y similares.

La resolución de mezclas racémicas también puede llevarse a cabo mediante elución en una columna empaquetada con un agente de resolución ópticamente activo (por ejemplo, dinitrobenzoilfenilglicina). Un experto en la técnica puede determinar la composición de solvente de elución adecuada.

Las sales de la invención y los compuestos también pueden incluir todos los isótopos de átomos que se producen en los productos intermedios o sales o compuestos finales. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio.

En algunas realizaciones, los compuestos o sales pueden encontrarse junto con otras sustancias como agua y solventes (por ejemplo, hidratos y solvatos) o pueden aislarse.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente, o sales de los mismos (por ejemplo, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I), están sustancialmente aislados. Por "sustancialmente aislado" se entiende que el compuesto está por lo menos parcial o sustancialmente separado del entorno en el que se formó o detectó. La separación parcial puede incluir, por ejemplo, una composición enriquecida en los compuestos. La separación sustancial puede incluir composiciones que contienen por lo menos aproximadamente el 50%, por lo menos aproximadamente el 60%, por lo menos aproximadamente el 70%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 90%, por lo menos aproximadamente el 95%, por lo menos aproximadamente el 97%, o por lo menos aproximadamente el 99% en peso de los compuestos, o sal de los mismos. Los métodos para aislar compuestos y sus sales son rutinarios en la técnica.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, excesivas acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como se apreciará, los compuestos proporcionados en la presente, incluyendo las sales del mismo, pueden prepararse usando técnicas de síntesis orgánica conocidas y pueden sintetizarse de acuerdo con cualquiera de las numerosas rutas sintéticas posibles. Los procesos descritos en la presente pueden monitorizarse de acuerdo con cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la formación del producto puede monitorizarse por medios espectroscópicos, como espectroscopía de resonancia magnética nuclear (por ejemplo, ^1H o ^{13}C), espectroscopía de infrarrojos, o espectrofotometría (por ejemplo, visible a UV); o por cromatografía como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC) u otras técnicas relacionadas.

Como se usa en la presente, el término "reaccionar" se usa como se conoce en la técnica y generalmente se refiere a la unión de reactivos químicos de tal manera que permita su interacción a nivel molecular para lograr una transformación química o física. En algunas realizaciones, la reacción implica dos reactivos, en donde se usan uno o más equivalentes del segundo reactivo con respecto al primer reactivo. Los pasos de reacción de los procesos descritos en la presente pueden realizarse durante un tiempo y en condiciones adecuadas para preparar el producto identificado.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo en solventes adecuados que pueden ser seleccionados fácilmente por un experto en la técnica de síntesis orgánica. Los solventes adecuados pueden ser sustancialmente no reactivos con los materiales de partida (reactivos), los productos intermedios, o los productos a las temperaturas a las que se llevan a cabo las reacciones, por ejemplo, temperaturas que pueden variar de la temperatura de congelación del solvente a la temperatura de ebullición del solvente. Una reacción dada puede llevarse a cabo en un solvente o una mezcla de más de un solvente. Dependiendo del paso de reacción particular, pueden seleccionarse solventes adecuados para un paso de reacción particular.

Los solventes adecuados pueden incluir solventes halogenados como tetracloruro de carbono, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromoformo, cloroformo, bromoclorometano, dibromometano, cloruro de butilo, diclorometano, tetracloroetileno, tricloroetileno, 1,1,1-tricloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,1-dicloroetano, 2-cloropropano, 1,2-dicloroetano, 1,2-dibromoetano, hexafluorobenceno, 1,2,4-triclorobenceno, 1,2-diclorobenceno, clorobenceno, fluorobenceno, mezclas de los mismos y similares.

Los solventes de éter adecuados incluyen: dimetoximetano, tetrahidrofurano, 1,3-dioxano, 1,4-dioxano, furano, éter dietílico, éter dimetílico de etilenglicol, éter dietílico de etilenglicol, éter dimetílico de dietilenglicol, éter dietílico de dietilenglicol, éter dimetílico de trietilenglicol, anisol, t-butil metil éter, mezclas de los mismos y similares.

Los solventes próticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, agua, metanol, etanol, 2-nitroetanol, 2-fluoroetanol, 2,2,2-trifluoroetanol, etilenglicol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metoxietanol, 1-butanol, 2-butanol, alcohol i-butílico, alcohol t-butílico, 2-etoxietanol, dietilenglicol, 1-, 2- o 3- pentanol, alcohol neo-pentílico, alcohol t-pentílico, éter monometílico de dietilenglicol, éter monoetílico de dietilenglicol, ciclohexanol, alcohol bencílico, fenol o glicerol.

Los solventes apróticos adecuados pueden incluir, a modo de ejemplo y sin limitación, tetrahidrofurano (THF), N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), 1,3-dimetil-3,4,5,6 -tetrahidro-2(1H)-pirimidinona (DMPU), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), N metilpirrolidinona (NMP), formamida, N-metilacetamida, N-metilformamida, acetonitrilo, dimetilsulfóxido, propionitrilo, formiato de etilo, acetato de metilo, hexacloroacetona, acetona, etil metil cetona, acetato de etilo, sulfolano, N,N-dimetilpropionamida, tetrametilurea, nitrometano, nitrobenceno o hexametilfosforamida.

Los solventes de hidrocarburos adecuados incluyen benceno, ciclohexano, pentano, hexano, tolueno, cicloheptano, metilciclohexano, heptano, etilbenceno, m-, o- o p-xileno, octano, indano, nonano o naftaleno.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden llevarse a cabo a temperaturas apropiadas que pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica. Las temperaturas de reacción dependerán, por ejemplo, de los puntos de fusión y ebullición de los reactivos y el solvente, si los hay; la termodinámica de la reacción (por ejemplo, puede ser necesario llevar a cabo reacciones exotérmicas vigorosas a temperaturas reducidas); y la cinética de la reacción (por ejemplo, una barrera de alta energía de activación puede necesitar temperaturas elevadas).

Las expresiones "temperatura ambiente" o "rt" como se usan en la presente, se entienden en la técnica y se refieren generalmente a una temperatura, por ejemplo, una temperatura de reacción, que es aproximadamente la temperatura de la habitación en la que se lleva a cabo la reacción, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 20° C a aproximadamente 30° C.

Las reacciones de los procesos descritos en la presente pueden realizarse al aire o bajo atmósfera inerte. Típicamente, las reacciones que contienen reactivos o productos que son sustancialmente reactivos con el aire pueden llevarse a cabo usando técnicas sintéticas sensibles al aire que son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Métodos de uso

Las sales de la invención y los compuestos pueden modular la actividad de una o más de varias quinasas que incluyen, por ejemplo, fosfoinosítido 3-quinasas (PI3K). Se entiende que el término "modular" se refiere a la capacidad de aumentar o disminuir la actividad de uno o más miembros de la familia PI3K. Por consiguiente, las sales de la invención pueden usarse en métodos para modular una PI3K poniendo en contacto la PI3K con una cualquiera o más de las sales, compuestos o composiciones descritas en la presente. En algunas realizaciones, las sales de la invención y los compuestos de la presente solicitud pueden actuar como inhibidores de una o más PI3K. En realizaciones adicionales, las sales de la invención pueden usarse para modular la actividad de una PI3K en un individuo que necesite modular el receptor mediante la administración de una cantidad moduladora de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, modular es inhibir.

Dado que el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas se ven afectados por múltiples vías de señalización, la presente solicitud es útil para tratar estados patológicos caracterizados por mutantes de quinasas resistentes a fármacos. Además, pueden usarse en combinación diferentes inhibidores de quinasas, que muestran diferentes preferencias en las quinasas cuyas actividades modulan. Este enfoque podría resultar muy eficaz en el tratamiento de estados patológicos al dirigirse a múltiples vías de señalización, reducir la probabilidad de que surja resistencia a los fármacos en una célula, y reducir la toxicidad de los tratamientos para la enfermedad.

Las quinasas a las que las presentes sales y compuestos se unen y/o modulan (por ejemplo, inhiben) incluyen cualquier miembro de la familia PI3K. En algunas realizaciones, la PI3K es PI3K α , PI3K β , PI3K δ o PI3K γ . En algunas realizaciones, la PI3K es PI3K δ o PI3K γ . En algunas realizaciones, la PI3K es PI3K δ . En algunas

realizaciones, la PI3K es PI3K γ . En algunas realizaciones, la PI3K incluye una mutación. Una mutación puede ser el reemplazo de un aminoácido por otro, o la delección de uno o más aminoácidos. En tales realizaciones, la mutación puede estar presente en el dominio quinasa de la PI3K.

5 En algunas realizaciones, se usa más de una sal o compuesto para inhibir la actividad de una quinasa (por ejemplo, PI3K δ o PI3K γ).

10 En algunas realizaciones, se usa más de una sal o compuesto para inhibir más de una quinasa, como por lo menos dos quinasas (por ejemplo, PI3K δ y PI3K γ).

En algunas realizaciones, se usa una o más de las sales o compuestos en combinación con otro inhibidor de quinasas para inhibir la actividad de una quinasa (por ejemplo, PI3K δ o PI3K γ).

15 En algunas realizaciones, se usa una o más de las sales o compuestos en combinación con otro inhibidor de quinasas para inhibir las actividades de más de una quinasa (por ejemplo, PI3K δ o PI3K γ), como por lo menos dos quinasas.

20 Las sales de la invención y los compuestos pueden ser selectivos. Por "selectivo" se entiende que el compuesto se une o inhibe una quinasa con mayor afinidad o potencia, respectivamente, en comparación con por lo menos otra quinasa. En algunas realizaciones, las sales de la invención y los compuestos son inhibidores selectivos de PI3K δ o PI3K γ sobre PI3K α y/o PI3K β . En algunas realizaciones, las sales de la invención y los compuestos son inhibidores selectivos de PI3K δ (por ejemplo, sobre PI3K α , PI3K β y PI3K γ). En algunas realizaciones, las sales de la invención y los compuestos son inhibidores selectivos de PI3K δ (por ejemplo, sobre PI3K α , PI3K β y PI3K γ). En algunas realizaciones, la selectividad puede ser por lo menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, por lo menos aproximadamente 20 veces, por lo menos aproximadamente 50 veces, por lo menos aproximadamente 100 veces, por lo menos aproximadamente 200 veces, por lo menos aproximadamente 500 veces o por lo menos aproximadamente 1000 veces. La selectividad puede medirse mediante métodos rutinarios en la técnica. En algunas realizaciones, la selectividad puede probarse a la concentración de K_m ATP de cada enzima. En algunas realizaciones, la selectividad de las sales de la invención y los compuestos puede determinarse mediante ensayos celulares asociados con una actividad quinasa de PI3K particular.

30 Otro aspecto de la presente solicitud se refiere a una sal de la invención para su uso en métodos para tratar una enfermedad o trastorno asociado a quinasas (como PI3K) en un individuo (por ejemplo, paciente) administrando al individuo con necesidad de dicho tratamiento una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de una o más sales o compuestos de la presente solicitud o una composición farmacéutica de los mismos. Una enfermedad asociada a PI3K puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que esté directa o indirectamente relacionada con la expresión o actividad de PI3K, incluyendo la sobreexpresión y/o niveles de actividad anormales. En algunas realizaciones, la enfermedad puede estar vinculada a Akt (proteína quinasa B), objetivo mamífero de rapamicina (mTOR) o quinasa 1 dependiente de fosfoinosítido (PDK1). En algunas realizaciones, la enfermedad relacionada con mTOR puede ser inflamación, aterosclerosis, psoriasis, reestenosis, hipertrofia prostática benigna, trastornos óseos, pancreatitis, angiogénesis, retinopatía diabética, aterosclerosis, artritis, trastornos inmunológicos, enfermedad renal o cáncer. Una enfermedad asociada a PI3K también puede incluir cualquier enfermedad, trastorno o afección que se pueda prevenir, mejorar o curar modulando la actividad de PI3K. En algunas realizaciones, la enfermedad se caracteriza por la actividad anormal de PI3K. En algunas realizaciones, la enfermedad se caracteriza por PI3K mutante. En tales realizaciones, la mutación puede estar presente en el dominio quinasa de PI3K.

35 Ejemplos de enfermedades asociadas a PI3K incluyen enfermedades de base inmunitaria que involucran al sistema incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide, alergia, asma, glomerulonefritis, lupus o inflamación relacionada con cualquiera de los anteriores.

40 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a PI3K incluyen cánceres como cáncer de mama, próstata, colon, endometrio, cerebro, vejiga, piel, útero, ovario, pulmón, páncreas, riñón, gástrico o hematológico.

45 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a PI3K incluyen enfermedades pulmonares como lesión pulmonar aguda (ALI) y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA).

50 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a PI3K incluyen osteoartritis, reestenosis, aterosclerosis, trastornos óseos, artritis, retinopatía diabética, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, inflamación, angiogénesis, pancreatitis, enfermedad renal, enfermedad inflamatoria intestinal, miastenia gravis, esclerosis múltiple o síndrome de Sjogren, y similares.

55 Ejemplos adicionales de enfermedades asociadas a PI3K incluyen púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), anemia hemolítica autoinmune (AIHA), vasculitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, pénfigo, nefropatía membranosa, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no de Hodgkin (LNH), linfoma de células pilosas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma folicular, linfoma

linfoplasmocítico, linfoma de zona marginal extraganglionar, linfoma de células B grandes difuso de tipo células B activadas (ABC) o linfoma de células B grandes difuso del centro germinal (GCB).

En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona de púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), anemia hemolítica autoinmune, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune (AIHA), nefropatía membranosa, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no de Hodgkin (LNH), leucemia de células pilosas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma folicular, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de zona marginal extraganglionar, linfoma de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia prolinfocítica, leucemia linfoblástica aguda, mielofibrosis, linfoma de tejido linfático asociado a mucosas (MALT), linfoma de células B, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma de derrame primario, linfoma de células B grandes intravascular, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma extramedular, mieloma latente (también conocido como mieloma asintomático), gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS) y linfoma de células B.

En algunas realizaciones, el método es un método para tratar púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) seleccionada de ITP recidivante e ITP refractaria.

En algunas realizaciones, el método es un método para tratar la vasculitis seleccionada de enfermedad de Behet, síndrome de Cogan, arteritis de células gigantes, polimialgia reumática (PMR), arteritis de Takayasu, enfermedad de Buerger (tromboangitis obliterante), vasculitis del sistema nervioso central, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, síndrome de Churg-Strauss, vasculitis mixta por crioglobulinemia (esencial o inducida por el virus de la hepatitis C (VHC)), púrpura de Henoch-Schonlein (HSP), vasculitis por hipersensibilidad, poliangeítis microscópica, granulomatosis de Wegener y vasculitis sistémica asociada a anticuerpos del citoplasma anti-neutrófilos (ANCA) (AASV).

En algunas realizaciones, el método es un método para tratar el linfoma no de Hodgkin (NHL) seleccionado de NHL recidivante, NHL refractario y NHL folicular recurrente.

En algunas realizaciones, el método es un método para tratar el linfoma de células B, en donde dicho linfoma de células B es linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

En algunas realizaciones, el método es un método para tratar el linfoma de células B, en donde dicho linfoma de células B es linfoma de células B grandes difuso del tipo activado por células B (ABC) o linfoma difuso de células B grandes de células B de centro germinal (GCB).

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es osteoartritis, reestenosis, aterosclerosis, trastornos óseos, artritis, retinopatía diabética, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, inflamación, angiogénesis, pancreatitis, enfermedad renal, enfermedad inflamatoria intestinal, miastenia gravis, esclerosis múltiple o síndrome de Sjogren.

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es artritis reumatoide, alergia, asma, glomerulonefritis, lupus o inflamación relacionada con cualquiera de las mencionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, dicho lupus es lupus eritematoso sistémico o nefritis lúpica.

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer gástrico, o un cáncer hematológico.

En algunas realizaciones, dicho cáncer hematológico es leucemia mieloblástica aguda o leucemia mieloide crónica.

En algunas realizaciones, dicho cáncer hematológico son enfermedades malignas linfoides de origen de células B que incluyen linfoma no de Hodgkin (NHL) de células B indolente/agresivo y linfoma de Hodgkin (HL).

En algunas realizaciones, dicha enfermedad es lesión pulmonar aguda (ALI) o síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS).

Como se usa en la presente, el término "poner en contacto" se refiere a reunir las fracciones indicadas en un sistema in vitro o en un sistema in vivo. Por ejemplo, "poner en contacto" una PI3K con un compuesto incluye la administración de un compuesto de la presente solicitud a un individuo o paciente, como un humano, que tiene una PI3K, así como, por ejemplo, introducir un compuesto en una muestra que contiene una preparación celular o purificada que contiene la PI3K.

Como se usa en la presente, el término "individuo" o "paciente", usado indistintamente, se refiere a

cualquier animal, incluyendo mamíferos, preferiblemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, vacas, ovejas, caballos o primates, y lo más preferible humanos.

Como se usa en la presente, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal que se busca en un tejido, sistema, animal, individuo o humano por un investigador, veterinario, doctor médico u otro practicante clínico. En algunas realizaciones, la dosificación del compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, administrada a un paciente o individuo es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 2 g, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 mg a 50 mg, o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 500 mg.

Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a uno o más de (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno pero que todavía no experimenta ni muestra la patología o sintomatología de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener el desarrollo adicional de la patología y/o sintomatología); y (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, condición o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, revertir la patología y/o sintomatología), como disminuir la gravedad de la enfermedad.

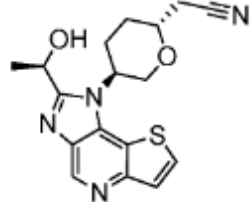
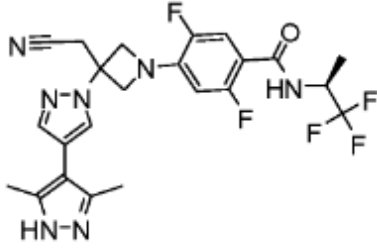
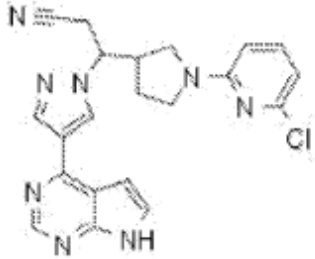
Terapias de combinación

Uno o más agentes farmacéuticos adicionales como, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, esteroides, inmunosupresores, así como inhibidores de quinasas Bcr-Abl, Flt-3, EGFR, HER2, JAK (por ejemplo, JAK1 o JAK2), c-MET, VEGFR, PDGFR, cKit, IGF-1R, RAF, FAK, Akt mTOR, PIM y AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2 o AKT3) como, por ejemplo, los descritos en la WO 2006/056399, u otros agentes como anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en combinación con las sales o compuestos de la presente solicitud para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas a PI3K. El uno o más agentes farmacéuticos adicionales pueden administrarse a un paciente simultánea o secuencialmente.

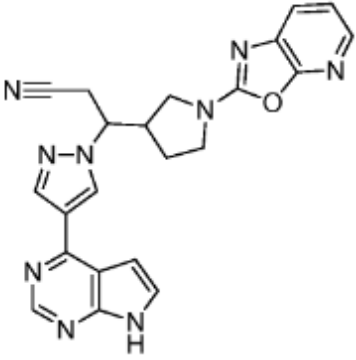
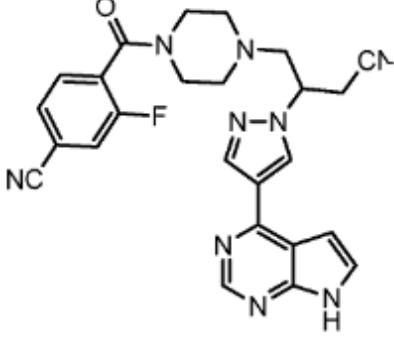
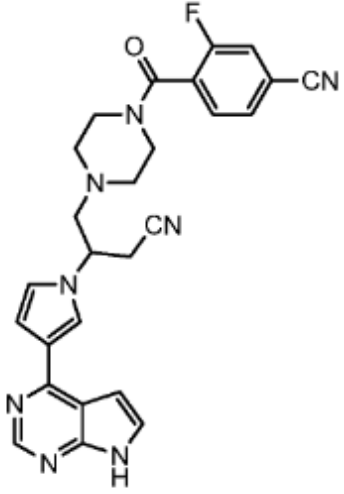
En algunas realizaciones, el agente farmacéutico adicional es un inhibidor de JAK1 y/o JAK2. En algunas realizaciones, la presente solicitud proporciona un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para tratar una enfermedad descrita en la presente (por ejemplo, una enfermedad maligna de células B, como linfoma difuso de células B) en un paciente que comprende administrar al paciente el compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un inhibidor de JAK1 y/o JAK2. Las enfermedades malignas de células B pueden incluir las descritas en la presente y en la U.S. Nº de serie 61/976.815, presentada el 8 de abril de 2014.

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 es un compuesto de la Tabla 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los compuestos de la Tabla 1 son inhibidores selectivos de JAK1 (selectivos sobre JAK2, JAK3 y TYK2). Las IC₅₀ obtenidas por el método del Ensayo A a ATP 1 mM se muestran en la Tabla 1.

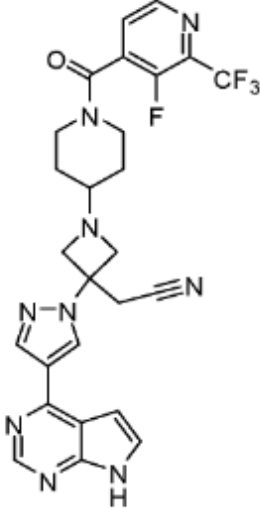
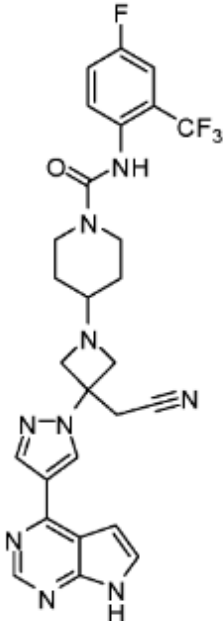
Tabla 1

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
1	US 2014/0121 198, (Ejemplo 20)	((2R,SS)-5-{2-[(1R)-1- hidroxietil]-1H-imidazo[4,5-d] tieno[3,2-b]piridin-1-il} tetrahydro-2H-piran-2-il) acetonitrilo		++	>10
2	US 2014/0343 030, (Ejemplo 7)	4-[3-(cianometil)-3-(3',5'- dimetil-1H,1'H-4,4'-bipirazol- 1-il)azetidin-1-il]-2,5-difluoro- N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1- metilolil]benzamida		+++	>10
3	US 2010/ 0298334 (Ejemplo 2) ^a	3-[1-(6-cloropiridin-2-il) pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrolo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H- pirazol-1-il]propanonitrilo		+	>10

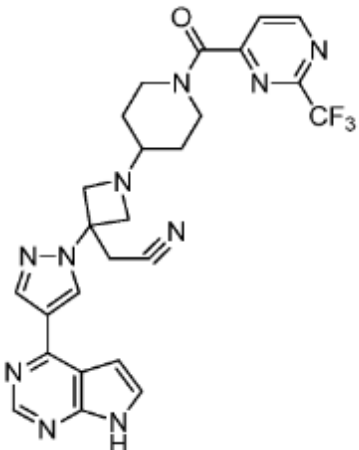
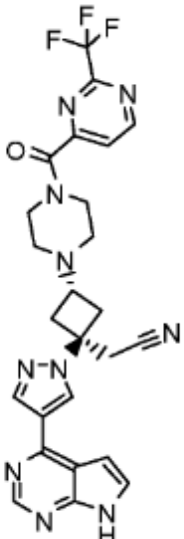
(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
4	US 2010/ 0298334 (Ejemplo 13c)	3-(1-[1,3]oxazolo[5,4-b]piridin-2-ilpirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo		+	>10
5	US 2011/ 0059951 (Ejemplo 12)	4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo		+	>10
6	US 2011/ 0059951 (Ejemplo 13)	4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo		+	>10

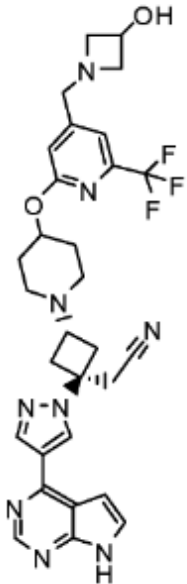
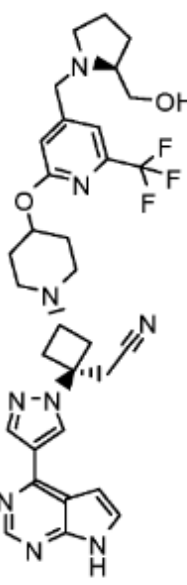
(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
7	US 2011/ 0224190 (Ejemplo 1)	{1-{1-[3-Fluoro- 2-(trifluorometil)isonicotin oíl] piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrólo [2,3-d]pirimidin-4-il)-1H- pirazol-1-il]azetidin-3-il} acetonitrilo		+	>10
8	US 2011/ 0224190 (Ejemplo 154)	4-{3-(Cianometil)-3-[4-(7H- pirrólo[2,3-d]pirimidin-4-il)-1H- pirazol-1-il]azetidin-1-il}-N-[4- fluoro-2-(trifluorometil)fenil] pi peridina-1-carboxamida		+	>10

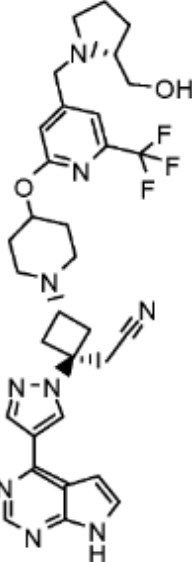
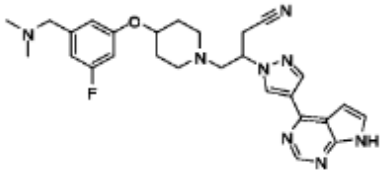
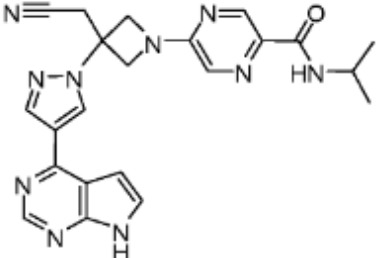
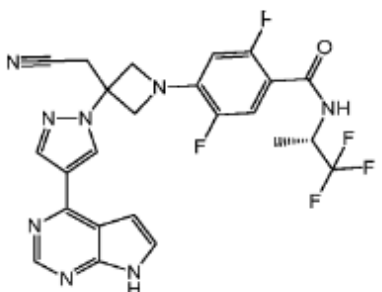
(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
9	US 2011/ 0224190 (Ejemplo 85)	[3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-1-(1-[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil)piperidin-4-il)azetidin-3-il]acetonitrilo		+	>10
10	US 2012/ 0149681 (Ejemplo 7b)	[trans-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]-3-(4-[[2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]carbonil]piperazin-1-il)ciclobutil]acetonitrilo		+	>10

(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
11	US 2012/ 0149681 (Ejemplo 157)	{ <i>trans</i> -3-(4-[[4-[(3-hidroxiacetidin-1-il)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetónitrilo		+	>10
12	US 2012/ 0149681 (Ejemplo 161)	{ <i>trans</i> -3-(4-[[4-[(2S)-2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il]metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetónitrilo		+	>10

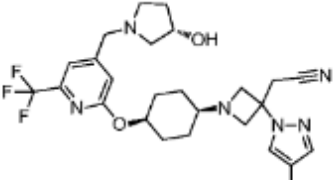
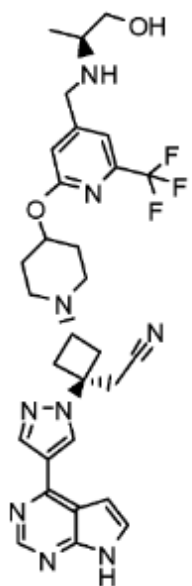
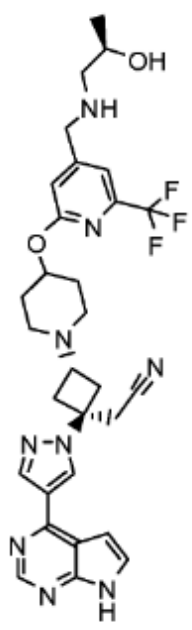
(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
13	US 2012/ 0149681 (Ejemplo 162)	{ <i>trans</i> -3-(4-[[4-[(2 <i>R</i>)- 2-(hidroximetil)pirrolidin-1-il] metil]-6-(trifluorometil) piridin-2-il]oxi]piperidin-1-il)- 1-[4-(7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidin- 4-il)-1 <i>H</i> -pirazol-1-il]ciclobutil} acetónitrilo		+	>10
14	US 2012/ 0149682 (Ejemplo 20) ^b	4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]- 5- fluorofenoxi]piperidin-1-il)- 3-[4- (7 <i>H</i> -pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidin- 4-il)- 1 <i>H</i> -pirazol-1-il] butanonitrilo		+	>10
15	US 2013/ 0018034 (Ejemplo 18)	5-{3-(cianometil)-3-[4-(7 <i>H</i> - pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4-il)-1 <i>H</i> - pirazol-1-il]azetidin-1-il}- <i>N</i> - isopropilpirazina-2- carboxamida		+	>10
16	US 2013/ 0018034 (Ejemplo 28)	4-{3-(cianometil)-3-[4-(7 <i>H</i> - pirrolo[2,3- <i>d</i>]pirimidin-4-il)-1 <i>H</i> - pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5- difluoro- <i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-2,2,2-trifluoro-1- metilolil]benzamida		+	>10

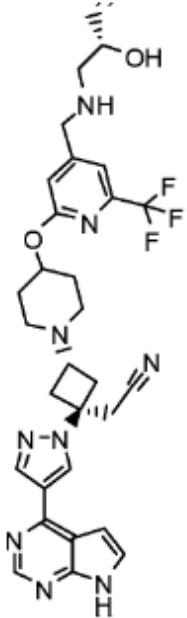
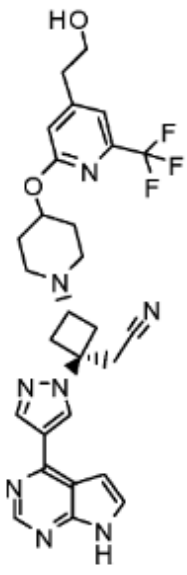
(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
17	US 2013/ 0018034 (Ejemplo 34)	5-{3-(cianometil)-3-[4-(1H-pirrol-2,3-b)piridin-4-il]-1H-pirazol-1-il}azetidin-1-il)-N-isopropilpirazina-2-carboxamida		+	>10
18	US 2013/ 0045963 (Ejemplo 45)	{1-(<i>cis</i> -4-[[6-(2-hidroxietil)-2-(trifluorometil)pirimidin-4-il]oxi]ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il} acetonitrilo		+	>10
19	US 2013/ 0045963 (Ejemplo 65)	{1-(<i>cis</i> -4-[[4-[(etilamino)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo		+	>10
20	US 2013/ 0045963 (Ejemplo 69)	{1-(<i>cis</i> -4-[[4-(1-hidroxi-1-metilol)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il}acetonitrilo		+	>10
21	US 2013/ 0045963 (Ejemplo 95)	{1-(<i>cis</i> -4-[[4-[[[(3R)-3-hidroxipirrolidin-1-il]metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi]ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-3-il} acetonitrilo		+	>10

(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
22	US 2013/ 0045963 (Ejemplo 95)	{1-(<i>cis</i> -4-([4-([(3 <i>S</i>)-3-hidroxi-pirrolidin-1-il]metil)- 6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi)ciclohexil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H- pirazol-1-il]azetidin-3-il} acetonitrilo		+	>10
23	US 2014/ 0005166 (Ejemplo 1)	{ <i>trans</i> -3-(4-{ [4-([(1 <i>S</i>)-2-hidroxi -1-metilolil]amino} metil)-6-(trifluorometil) piridin-2-il]oxi)piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetonitrilo		+	>10
24	US 2014/ 0005166 (Ejemplo 14)	{ <i>trans</i> -3-(4-([4-([(2 <i>R</i>)-2-hidroxi-propil]amino)metil)- 6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi)piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetonitrilo		+	>10

(continuación)

#	Prep.	Nombre	Estructura	JAK1 IC ₅₀ (nM)	JAK2/ JAK1
25	US 2014/ 0005166 (Ejemplo 15)	{ <i>trans</i> -3-(4-[[4-(((2 <i>S</i>)-2-hidroxiopropil)amino)metil]-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi)piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetónitrilo		+	>10
26	US 2014/ 0005166 (Ejemplo 20)	{ <i>trans</i> -3-(4-[[4-(2-hidroxietil)-6-(trifluorometil)piridin-2-il]oxi)piperidin-1-il)-1-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]ciclobutil} acetónitrilo		+	>10
+ significa <10 nM ++ significa ≤ 100 nM +++ significa ≤ 300 nM ^a Datos para enantiómero 1 ^b Datos para enantiómero 2					

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 es {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetid-3-il}acetónitrilo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 es sal del ácido adípico de {1-{1-[3-fluoro-2-(trifluorometil)isonicotinoil]piperidin-4-il}-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-4-il)-1H-pirazol-1-il]azetid-3-il}acetónitrilo.

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 es 4-{3-(cianometil)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d]pirimidin-

4-il)-1H-pirazol-1-il]azetidin-1-il}-2,5-difluoro-N-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-metiletil]benzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 se selecciona de (R)-3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (R)-3-(1-[1,3]oxazol-5,4-b)piridin-2-il)pirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (R)-4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, (R)-4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, o (R)-4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo, (S)-3-[1-(6-cloropiridin-2-il)pirrolidin-3-il]-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (S)-3-(1-[1,3]oxazol-5,4-b)piridin-2-il)pirrolidin-3-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propanonitrilo, (S)-4-[(4-{3-ciano-2-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, (S)-4-[(4-{3-ciano-2-[3-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirrol-1-il]propil}piperazin-1-il)carbonil]-3-fluorobenzonitrilo, (S)-4-(4-{3-[(dimetilamino)metil]-5-fluorofenoxi}piperidin-1-il)-3-[4-(7H-pirrol-2,3-d)pirimidin-4-il]-1H-pirazol-1-il]butanonitrilo; y sales farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, el inhibidor de JAK1 y/o JAK2 se selecciona de los compuestos de la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2010/0298334, presentada el 21 de mayo de 2010, publicación de Patente de Estados Unidos N° 2011/0059951, presentada el 31 de agosto de 2010, publicación de Patente de Estados Unidos N° 2011/0224190, presentada el 9 de marzo de 2011, publicación de Patente de Estados Unidos N° 2012/0149681, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de Patente de Estados Unidos N° 2012/0149682, presentada el 18 de noviembre de 2011, publicación de patente de EE.UU. 2013/0018034, presentada el 19 de junio de 2012, publicación de Patente de Estados Unidos N° 2013/0045963, presentada el 17 de agosto de 2012, y la publicación de Patente de Estados Unidos N° 2014/0005166, presentada el 17 de mayo de 2013.

Los anticuerpos ejemplares para su uso en terapia de combinación incluyen, entre otros, trastuzumab (por ejemplo, anti-HER2), ranibizumab (por ejemplo, anti-VEGF-A), bevacizumab (Avastin™, por ejemplo, anti-VEGF), panitumumab (por ejemplo, anti-EGFR), cetuximab (por ejemplo, anti-EGFR), rituximab (Rituxan™, anti-CD20) y anticuerpos dirigidos a c-MET.

Pueden usarse uno o más de los siguientes agentes en combinación con las sales o compuestos de la presente solicitud y se presentan como una lista no limitativa: un agente citostático, cisplatino, doxorubicina, taxotere, taxol, etopósido, irinotecán, camptostar, topotecán, paclitaxel, docetaxel, epotilonas, tamoxifeno, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolomida, ciclofosfamida, SCH 66336, R115777, L778, 123, BMS 214662, Iressa, Tarceva, anticuerpos contra EGFR, Gleevec™, intrón, ara-C, adriamicina, Citoxano, gemcitabina, uracilo mostaza, clormetina, ifosfamida, melfalan, clorambucilo, pipobroman, trietilenmelamina, trietilenofofosforamina, busulfano, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, oxaliplatino, leucovorina, ELOXATIN™, pentostatina, vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, mitramicina, desoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, teniposide 17.alfa.-Ethinilestradiol, dietilestilbestrol, testosterona, prednisona, fluoximesterona, propionato de dromostanolona, testolactona, megestrolacetato, metilprednisolona, metiltestosterona, prednisolona, triamcinolona, clorotrianiseno, hidroxiprogesterona, aminoglutetimida, estramustina, acetato de medroxiprogesterona, leuprolida, flutamida, toremifeno, goserelina, cisplatino, carboplatino, hidroxiurea, amsacrina, procabazina, mitotano, mitoxantrona, levamisol, navelbeno, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, droloxafina, hexametilmelamina, avastina, herceptina, Bexxar, Velcade, Zevalin, Trisenox, Xeloda, vinorelbina, Porfimer, Erbitux, Liposomal, Thiotepa, altretamina, Melfalan, Trastuzumab, lerozol, Fulvestrant, exemestano, Fulvestrant, ifosfomida, Rituximab, C225, Campath, clofarabina, cladribina, afidicolon, rituxan, sunitinib, dasatinib, tezacitabina, Sml1, fludarabina, pentostatina, triapina, didox, trimidox, amidox, 3-AP, MDL-101,731, bendamustina (Treanda), ofatumumab y GS-1101 (también conocido como CAL-101).

Los agentes quimioterapéuticos de ejemplo incluyen inhibidores de proteosomas (por ejemplo, bortezomib), talidomida, revlimid y agentes que dañan el ADN como melfalán, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, etopósido, carmustina y similares.

Los esteroides de ejemplo incluyen corticosteroides como dexametasona o prednisona.

Los inhibidores de Bcr-Abl de ejemplo incluyen los compuestos, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, de los géneros y especies divulgados en la Patente de Estados Unidos N° 5.521.184, WO 04/005281 y N° de serie de Estados Unidos 60/578.491.

Los inhibidores de Flt-3 de ejemplo adecuados incluyen compuestos y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en la WO 03/037347, WO 03/099771 y WO 04/046120.

Los inhibidores de RAF de ejemplo adecuados incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en la WO 00/09495 y WO 05/028444.

Los de inhibidores de FAK adecuados de ejemplo incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en la WO 04/080980, WO 04/056786, WO 03/024967, WO 01/064655, WO 00/053595 y WO 01/014402.

Los de inhibidores de mTOR adecuados de ejemplo incluyen compuestos, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se divulga en la WO 2011/025889.

En algunas realizaciones, las sales de la invención pueden usarse en combinación con uno o más de otros inhibidores de quinasas, incluyendo imatinib, particularmente para tratar pacientes resistentes a imatinib u otros inhibidores de quinasas.

En algunas realizaciones, las sales de la invención pueden usarse en combinación con un agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer, como el mieloma múltiple, y pueden mejorar la respuesta al tratamiento en comparación con la respuesta al agente quimioterapéutico solo, sin exacerbación de sus efectos tóxicos. Ejemplos de agentes farmacéuticos adicionales usados en el tratamiento del mieloma múltiple, por ejemplo, pueden incluir, sin limitación, melfalán, melfalán más prednisona [MP], doxorubicina, dexametasona y Velcade (bortezomib). Otros agentes adicionales usados en el tratamiento del mieloma múltiple incluyen inhibidores de quinasas Bcr-Abl, Flt-3, RAF y FAK. Los efectos aditivos o sinérgicos son resultados deseables de la combinación de un inhibidor de PI3K de la presente solicitud con un agente adicional. Además, la resistencia de las células de mieloma múltiple a agentes como dexametasona puede ser reversible tras el tratamiento con el inhibidor de PI3K de la presente solicitud. Los agentes pueden combinarse con el presente compuesto en una forma de dosificación única o continua, o los agentes pueden administrarse simultánea o secuencialmente como formas de dosificación separadas.

En algunas realizaciones, se administra un corticosteroide como dexametasona a un paciente en combinación con las sales de la invención donde la dexametasona se administra intermitentemente en lugar de continuamente.

En algunas realizaciones adicionales, pueden administrarse combinaciones de las sales de la invención con otros agentes terapéuticos a un paciente antes, durante y/o después de un trasplante de médula ósea o de células madre.

Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, las sales de la invención pueden administrarse en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden prepararse de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y pueden administrarse mediante una variedad de vías, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo transdérmica, epidérmica, oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración intranasal, vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal o intranasal), oral o parenteral. La administración parenteral incluye administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular o inyección o infusión; o intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración parenteral puede ser en forma de una sola dosis en bolo o puede ser, por ejemplo, mediante una bomba de perfusión continua. Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, espráis, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares.

Esta invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, la sal de la invención (por ejemplo, la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I), en combinación con uno o más portadores (excipientes) farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición es adecuada para administración tópica. Al elaborar las composiciones de la invención, el ingrediente activo se mezcla típicamente con un excipiente, se diluye por un excipiente o se encierra dentro de dicho portador en forma de, por ejemplo, una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, bolsitas, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta un 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina duras y blandas, supositorios, soluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

Al preparar una formulación, el compuesto activo o la sal puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo o la sal es sustancialmente insoluble, puede molerse hasta un tamaño de partícula de menos de 200 mesh. Si el compuesto activo o la sal es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula puede ajustarse moliendo para

proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, aproximadamente 40 mesh.

Las sales de la invención y los compuestos pueden molerse usando procedimientos de molienda conocidos como molienda en húmedo para obtener un tamaño de partícula apropiado para la formación de comprimidos y para otros tipos de formulaciones. Las preparaciones finamente divididas (nanoparticuladas) de las sales de la invención pueden prepararse mediante procesos conocidos en la técnica, por ejemplo, ver la Solicitud Internacional N° WO 2002/000196.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y suspensores; agentes conservantes como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, cada dosificación conteniendo de aproximadamente 5 a aproximadamente 1000 mg (1 g), más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 mg, del ingrediente activo. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg del ingrediente activo. Un experto en la técnica apreciará que esto incluye composiciones que contienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 10, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35, de aproximadamente 35 a aproximadamente 40, de aproximadamente 40 a aproximadamente 45, o de aproximadamente 45 a aproximadamente 50 mg del ingrediente activo.

En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen aproximadamente 2,5, aproximadamente 5, aproximadamente 7,5, aproximadamente 10, aproximadamente 12,5, aproximadamente 15, aproximadamente 17,5, aproximadamente 20, aproximadamente 22,5 o aproximadamente 25 mg del ingrediente activo. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen aproximadamente 5 mg del ingrediente activo. En algunas realizaciones, las composiciones de la invención contienen aproximadamente 10 mg del ingrediente activo.

Pueden usarse dosificaciones similares de los compuestos y sales descritos en la presente en los métodos y usos de la invención.

El compuesto activo o la sal puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificaciones y generalmente se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de compuesto o sal realmente administrada será habitualmente determinada por un médico, de acuerdo con las circunstancias relevantes, incluyendo la afección a tratar, la vía elegida de administración, el compuesto o la sal real administrada, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto o sal de la presente solicitud. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el ingrediente activo se dispersa típicamente uniformemente por toda la composición de tal manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide luego en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg del ingrediente activo de la presente solicitud.

Los comprimidos o píldoras de la presente solicitud pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interior y un componente de dosificación exterior, este último estando en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en su liberación. Pueden usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyendo una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las sales, y las composiciones de la presente solicitud para la administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden respirarse directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede conectarse a una máscara facial, mascarilla, o respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo pueden administrarse por vía oral o nasal desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

Las formulaciones tópicas pueden contener uno o más portadores convencionales. En algunas realizaciones, las pomadas pueden contener agua y uno o más portadores hidrófobos seleccionados de, por ejemplo, parafina líquida, polioxietilén alquil éter, propilenglicol, vaselina blanca y similares. Las composiciones portadoras de cremas pueden basarse en agua en combinación con glicerol y uno o más de otros componentes, por ejemplo, monoestearato de glicerina, monoestearato de PEG-glicerina y alcohol cetilestearílico. Los geles pueden formularse usando alcohol isopropílico y agua, adecuadamente en combinación con otros componentes como, por ejemplo, glicerol, hidroxietilcelulosa y similares. En algunas realizaciones, las formulaciones tópicas contienen por lo menos aproximadamente 0,1, por lo menos aproximadamente 0,25, por lo menos aproximadamente 0,5, por lo menos aproximadamente 1, por lo menos aproximadamente 2, o por lo menos aproximadamente un 5% en peso del compuesto o sal de la invención. Las formulaciones tópicas pueden envasarse adecuadamente en tubos de, por ejemplo, 100 g que se asocian opcionalmente con instrucciones para el tratamiento de la indicación seleccionada, por ejemplo, psoriasis u otra afección de la piel.

La cantidad de compuesto, sal o composición administrada a un paciente variará dependiendo de lo que se esté administrando, el propósito de la administración, como profilaxis o terapia, el estado del paciente, la manera de administración y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o por lo menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las dosis efectivas dependerán del estado de enfermedad que se esté tratando así como del juicio del médico que lo atiende, dependiendo de factores como la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso y el estado general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en forma de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, la preparación liofilizada combinándose con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones de compuestos estará típicamente entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 y lo más preferiblemente entre 7 y 8. Se entenderá que el uso de algunos de los excipientes, portadores o estabilizantes anteriores dará como resultado la formación de sales farmacéuticas.

La dosificación terapéutica de un compuesto o sal de la presente solicitud puede variar de acuerdo con, por ejemplo, el uso particular para el que se realiza el tratamiento, la manera de administración del compuesto o sal, la salud y el estado del paciente, y el juicio del médico que prescribe. La proporción o concentración de un compuesto o sal de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de una serie de factores que incluyen dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobicidad) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos y sales de la invención se pueden proporcionar en una solución de tampón fisiológica acuosa que contiene de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 10% p/v del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. Es probable que la dosificación dependa de variables como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud general del paciente en particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o in vitro.

Las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más agentes farmacéuticos adicionales como agentes quimioterapéuticos, esteroides, compuestos antiinflamatorios o inmunosupresores, ejemplos de los cuales se proporcionan en la presente.

Kits

La presente solicitud también incluye kits farmacéuticos útiles, por ejemplo, en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos asociados a PI3K, como el cáncer, que incluyen uno o más recipientes que contienen una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto. Tales kits pueden incluir además, si se desea, uno o más de varios componentes de kits farmacéuticos convencionales como, por ejemplo, recipientes con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, recipientes adicionales, etc., como será fácilmente evidente para los expertos en la técnica. También pueden incluirse en el kit instrucciones, ya sea en forma de prospectos o etiquetas, que indican las cantidades de los componentes que se van a administrar, las pautas de administración y/o las pautas para mezclar los componentes.

La invención se describirá con mayor detalle a modo de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados. Se ha descubierto que la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I y el compuesto de Fórmula I son inhibidores de PI3K de acuerdo con por lo menos un ensayo descrito en la presente.

EJEMPLOS

La invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten la invención de ninguna manera. Los compuestos de ejemplo, o sales de los mismos, que contienen uno o más centros quirales se obtuvieron en forma de racemato o como mezclas isoméricas, a menos que se especifique lo contrario.

Métodos generales

Las purificaciones LC-MS preparativas de algunos de los compuestos preparados se realizaron en sistemas de fraccionamiento dirigido de masa de Waters. La configuración básica del equipo, los protocolos y el software de control para el funcionamiento de estos sistemas se han descrito en detalle en la literatura. Ver, por ejemplo, "Two-Pump At Column Dilution Configuration for Preparative LC-MS", K. Blom, J. Combi. Chem., 4, 295 (2002); "Optimizing Preparative LC-MS Configurations and Methods for Parallel Synthesis Purification", K. Blom, R. Sparks, J. Doughty, G. Everlof, T. Haque, A. Combs, J. Combi. Chem., 5, 670 (2003); y "Preparative LC-MS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Combi. Chem., 6, 874-883 (2004). Los compuestos separados se sometieron típicamente a espectrometría de masas de cromatografía líquida analítica (LCMS) para análisis de pureza en las siguientes condiciones: Instrumento, serie Agilent 1100, LC/MSD, columna: Waters Sunfire™ C₁₈ 5 µm, 2,1 x 50 mm, tampones: fase móvil A: TFA al 0,025% en agua y fase móvil B: acetonitrilo; gradiente del 2% al 80% de B en 3 minutos con caudal de 2,0 ml/minuto.

Algunos de los compuestos preparados también se separaron a una escala preparativa mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con detector de MS o cromatografía ultrarrápida (gel de sílice) como se indica en los Ejemplos. Las condiciones típicas de la columna de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa preparativa (RP-HPLC) son las siguientes:

pH = 2 purificaciones: columna Waters Sunfire™ C₁₈ 5 µm, 19 x 100 mm, eluyendo con fase móvil A: TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1% en agua y fase móvil B: acetonitrilo; el caudal fue de 30 ml/minuto, el gradiente de separación se optimizó para cada compuesto usando el protocolo de optimización del método específico del compuesto como se describe en la literatura [ver "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Típicamente, el caudal usado con la columna de 30 x 100 mm fue de 60 ml/minuto.

pH = 10 purificaciones: columna Waters XBridge C₁₈ 5 µm, 19 x 100 mm, eluyendo con fase móvil A: 0,15% de NH₄OH en agua y fase móvil B: acetonitrilo; el caudal fue de 30 ml/minuto, el gradiente de separación se optimizó para cada compuesto usando el protocolo de optimización del método específico del compuesto como se describe en la literatura [Ver "Preparative LCMS Purification: Improved Compound Specific Method Optimization", K. Blom, B. Glass, R. Sparks, A. Combs, J. Comb. Chem., 6, 874-883 (2004)]. Típicamente, el caudal usado con una columna de 30 x 100 mm fue de 60 ml/minuto.

Algunos de los compuestos preparados también se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las condiciones típicas del instrumento DSC son las siguientes:

Calorimetría diferencial de barrido de TA instrument, modelo Q200 con automuestreador: 30-350° C a 10° C/min; Plato y tapa para muestras de aluminio T-cero; flujo de gas nitrógeno a 50 ml/min.

Instrumento 822 de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de Mettler Toledo: 40-340° C a una velocidad de calentamiento de 10° C/min.

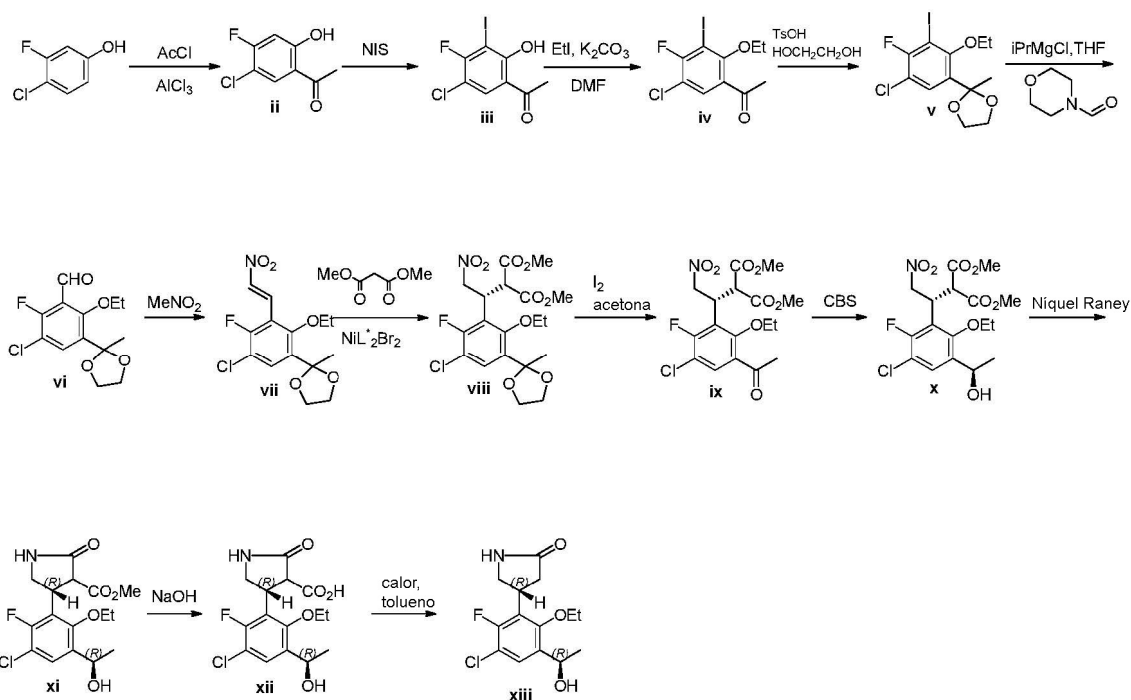
Algunos de los compuestos preparados también se analizaron mediante análisis termogravimétrico (TGA). Las condiciones típicas del instrumento de TGA son las siguientes:
 Analizador termogravimétrico de TA Instrument, modelo Pyris: rampa de temperatura de 25° C a 300° C a 10° C/min; flujo de gas de purga de nitrógeno a 60 ml/min; Portamuestras de crisol de cerámica TGA.

TA Instrument Q500: rampa de temperatura de 20° C a 300° C a 10° C/min.

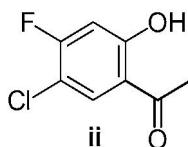
Algunos de los compuestos preparados también se analizaron mediante difracción de rayos X de polvo (XRPD). Las condiciones típicas del instrumento de XRPD son las siguientes:
 Instrumento difractómetro de rayos X de polvo Bruker D2 PHASER: Longitud de onda de radiación de rayos X: 1,05406 Å CuKAl; potencia de rayos X: 30 KV, 10 mA; polvo de muestra: disperso en un portamuestras de fondo cero; condiciones generales de medición: ángulo de inicio - 5 grados, ángulo de parada - 60 grados, muestreo - 0,015 grados, velocidad de escaneo - 2 grados/min.

Difractómetro de polvo Rigaku Miniflex: Cu a 1.054056 Å con filtro Kβ; condiciones generales de medición: ángulo de inicio - 3 grados, ángulo de parada - 45 grados, muestreo - 0,02 grados, velocidad de escaneo - 2 grados/min.

Ejemplo 1. Síntesis de (R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)pirrolidin-2-ona



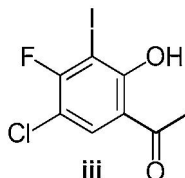
Paso 1. 1-(5-Cloro-4-fluoro-2-hidroxifenil)etanona (ii)



Se cargaron 4-cloro-3-fluorofenol (i, 166 g, 1,11 mol) y cloruro de acetilo (107 ml, 1,50 mol) en un matraz de 5 l a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó y se convirtió en una solución transparente mientras se registraba que la temperatura del lote disminuía a 6° C. Después, la mezcla de la reacción se calentó a 60° C durante 2 h. La mezcla de la reacción se cargó con nitrobeneno (187,5 ml, 1,82 mol) y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. Luego, se añadió tricloruro de aluminio (160 g, 1,2 mmol) a la mezcla en tres porciones (50 g, 50 g y 60 g a intervalos de 5 minutos). La temperatura del lote aumentó a 78° C una vez completada la adición. Luego, la mezcla de la reacción se calentó a 100-120°C durante 3 h, momento en el que el análisis de HPLC mostró que la reacción se había completado. Luego, la mezcla de la reacción se enfrió a 0° C y se cargó con hexanos (0,45 l), acetato de etilo (0,55 l), y luego se cargó lentamente con ácido clorhídrico acuoso 1,0 N (1,0 l) a temperatura ambiente. La adición de ácido clorhídrico acuoso fue exotérmica y la temperatura del lote aumentó de 26° C a 60° C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. Las capas se separaron y la capa orgánica se

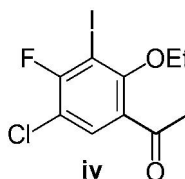
lavó secuencialmente con ácido clorhídrico acuoso 1,0 N (2 x 600 ml) y agua (400 ml). Luego, la capa orgánica se extrajo con solución de hidróxido de sodio acuosa 1,0 N (2 x 1,4 l). Las soluciones básicas combinadas se acidificaron a pH 2 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 12 N hasta que no se separó más precipitado. El sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó en el embudo de filtración bajo succión para dar el compuesto **ii** como un sólido amarillo (187,4 g, 89,5%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12.44 (d, J=1.4 Hz, 1H), 7.78 (d, J=8.1 Hz, 1H), 6.77 (d, J=10.2 Hz, 1H), 2.61 (s, 3H).

Paso 2. 1-(5-cloro-4-fluoro-2-hidroxi-3-yodofenil)etanona (iii)



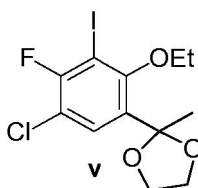
Se disolvió 1-(5-cloro-4-fluoro-2-hidroxifenil)etanona (**ii**, 100,0 g, 530,3 mmol) en ácido acético (302 ml) y se añadió N-yodosuccinimida (179,2 g, 796,5 mmol) a la solución. La mezcla de la reacción se agitó entre aproximadamente 61° C y aproximadamente 71° C durante 2 h, momento en el que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. Luego, la mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió agua (613 ml) y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El producto se recogió por filtración y se lavó con agua para producir sólidos marrones. El producto húmedo se disolvió en ácido acético (400 ml) a 60°C. Se añadió agua (800 ml) (durante 15 min) a la solución para precipitar el producto puro. El producto se recogió por filtración y se lavó con agua (100 ml). El producto se secó en el embudo de filtración bajo succión durante 18 h para dar el compuesto **iii** en forma de un sólido marrón (164,8 g, rendimiento del 95,0%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 13.34 (s, 1H), 8.26 (d, J=8.4 Hz, 1H), 2.68 (s, 3H).

Paso 3. 1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-yodofenil)etanona (iv)



En un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un condensador y un termómetro, se disolvió 1-(5-cloro-4-fluoro-2-hidroxi-3-yodofenil)etanona (**iii**, 280 g, 840 mmol) en N,N-dimetilformamida (600 ml). Durante la disolución, la temperatura interna descendió de 19,3° C a 17,0° C. Se añadió yodoetano (81,2 ml, 1020 mmol) a la mezcla resultante. Luego, se añadió carbonato de potasio (234 g, 1690 mmol) durante 2 min a la mezcla de la reacción y no se observó ningún cambio en la temperatura del lote. La mezcla de la reacción se calentó a 60° C durante 3 h, momento en el que el análisis HPLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de la reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y el producto se recogió por filtración. Los sólidos se disolvieron en una mezcla de DCM (1,0 l), hexano (500 ml) y agua (2,1 l). El sistema bifásico se agitó a 20° C durante 20 min. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con DCM (1,0 l). La capa orgánica combinada se lavó con agua (2 x 250 ml) y salmuera (60 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío hasta la sequedad para dar el compuesto **iv** como un sólido amarillo (292 g, rendimiento del 94%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.69 (d, J=8.4 Hz, 1H), 3.95 (q, J=7.0 Hz, 2H), 2.62 (s, 3H), 1.49 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₀H₁₀ClFIO₂ (M+H)⁺: m/z=342.9.

Paso 4. 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluor-3-yodofenil)-2-metil-1,3-dioxolano (v)

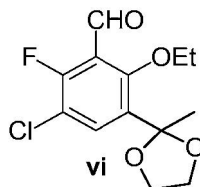


Se trató una solución de 1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-yodofenil)etanona (**iv**, 250,0 g, 693,4 mmol) y 1,2-etanodiol (58,0 ml, 1040 mmol) en tolueno (1.5 l) con monohidrato de ácido *p*-toluenosulfónico (10,6 g, 55,5 mmol). El matraz de reacción se equipó con una trampa Dean-Stark y la mezcla se calentó a reflujo durante 7 h. El análisis

LCMS indicó que la mezcla de la reacción contenía un 8,3% de material de partida y un 91,7% de producto. La mezcla de la reacción se enfrió a 106° C y se introdujo una cantidad adicional de 1,2-etanodiol (11,6 ml, 208 mmol) mediante una jeringuilla. Luego, la mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 8 h adicionales. El análisis LCMS indicó que la mezcla de la reacción contenía un 3,6% de material de partida y un 96,4% de producto. La mezcla de la reacción se enfrió a 106°C y se introdujo 1,2-etanodiol adicional (7,73 ml, 139 mmol) mediante una jeringuilla. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 15,5 h adicionales. El análisis LCMS indicó que la mezcla de la reacción contenía un 2,2% de material de partida y 97,8% de producto.

Luego, la mezcla de la reacción se enfrió a 0° C y se añadieron agua (200 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (300 ml) para ajustar la mezcla a un pH de 9. Se añadió DCM (200 ml) y el lote se agitó durante 10 min. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con tolueno (300 ml). La capa orgánica combinada se lavó secuencialmente con una mezcla de agua (200 ml) y NaHCO₃ acuoso saturado (200 ml), agua (300 ml), salmuera (300 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío hasta la sequedad para proporcionar el compuesto bruto como un sólido marrón claro (268 g, rendimiento del 100%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, J=8.6 Hz, 1H), 4.26-3.96 (m, 4H), 3.92-3.72 (m, 2H), 1.74 (s, 3H), 1.50 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₂H₁₄ClFIO₃ (M+H)⁺: m/z=387.0.

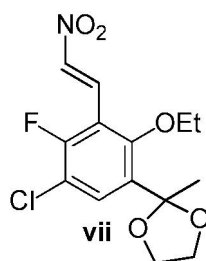
Paso 5. 3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)benzaldehído (vi)



A una solución agitada de 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-yodofenil)-2-metil-1,3-dioxolano (**v**, 135,0 g, 349,2 mmol) (86,8% de pureza por HPLC con 5,5% de la cetona) en tetrahidrofurano anhidro (300 ml) a aproximadamente de 0° C a aproximadamente 3° C se le añadió lentamente complejo de cloruro de litio cloruro de isopropilmagnesio 1,3 M en THF (322,3 ml, 419,0 mmol) durante 1 h. La mezcla de la reacción se agitó a de aproximadamente 0° C a aproximadamente 5° C durante 30 min, momento en el cual el análisis LCMS indicó que la reacción de intercambio de yodo-magnesio se había completado. Luego, se añadió a la mezcla de la reacción N-formilmorfolina (71,1 ml, 700 mmol) durante 1 h a de aproximadamente 0° C a aproximadamente 8° C. La mezcla de la reacción se agitó a de aproximadamente 0° C a aproximadamente 8° C durante 1 hora adicional, momento en el que los análisis LCMS y HPLC mostraron que el material de partida se había consumido y se observó una cantidad significativa de subproducto de la desyodación 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)-2-metil-1,3-dioxolano. La reacción se inactivó con una solución acuosa de ácido cítrico (120,8 g, 628,6 mmol) en agua (1,20 l) a 0° C. Luego, la mezcla de la reacción inactivada se extrajo con EtOAc (2 x 600 ml). Las fases se separaron fácilmente. La capa orgánica combinada se lavó secuencialmente con agua (300 ml) y salmuera (500 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida sobre gel de sílice con EtOAc/hexano al 0-10% para dar el producto bruto compuesto **vi** como un sólido amarillo pálido, que era una mezcla del producto deseado, 3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)benzaldehído (**vi**, 80 g, 80%) que contenía un 36% en moles del subproducto de desyodación, 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)-2-metil-1,3-dioxolano como se indica por análisis de NMR. El producto bruto compuesto **vi** se purificó adicionalmente mediante la formación del correspondiente aducto de bisulfito de sodio.

Se disolvió bisulfito de sodio (36,91 g, 354,7 mmol) en agua (74,3 ml, 4121 mmol). A una solución agitada de 3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)benzaldehído bruto (**vi**, 80,00 g, 177,3 mmol) en acetato de etilo (256,0 ml), la solución de bisulfito de sodio recién preparada se añadió en una porción. La solución se agitó durante aproximadamente 10 min y se observaron precipitados. Luego, la lechada se agitó durante 1 h adicional. El aducto de aldehído-bisulfito se recogió por filtración, se lavó con EtOAc y se secó al vacío y en atmósfera de nitrógeno durante 20 h para dar un sólido blanco (58,2 g, rendimiento del 83,6%). Al aducto de aldehído-bisulfito (58,2 g, 148 mmol) mezclado en hidróxido de sodio acuoso 1,0 M (296 ml, 296 mmol) se le añadió metil t-butil éter (600 ml) (MTBE). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 min para dar una mezcla bifásica transparente y se continuó agitando durante 5 min adicionales. Se recogió la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa con MTBE (2 x 300 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (300 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para dar el compuesto **vi** puro como un sólido cristalino blanco (31,4 g, rendimiento del 73,4%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 10.27 (s, 1H), 7.78 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.10-3.96 (m, 4H), 3.87-3.76 (m, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.44 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₃H₁₅ClFO₄ (M+H)⁺: m/z=289.0.

Paso 6. (E)-2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-(2-nitrovinil)fenil)-2-metil-1,3-dioxolano (vii)



En un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 5 l equipado con agitador superior, tabiques, termopar, entrada de nitrógeno y condensador se cargó 3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)benzaldehído (**vi**), 566,2 g, 1961 mmol), nitrometano (1060 ml, 19600 mmol) y ácido acético glacial (1120 ml). Luego, la mezcla de la reacción se cargó con bencilamina (53,6 ml, 490 mmol) y la mezcla resultante se calentó a 60° C y la reacción se monitorizó mediante LCMS durante 5,5 h. Se realizó un análisis de referencia inicial en $t = 0$. La reacción se comprobó después de 2 h y 5 h. Después de 2 h, había aproximadamente un 20% del material de partida aldehído sin reaccionar. Después de 5 h, el perfil de reacción fue el siguiente: material de partida compuesto **vi** (<2%), producto intermedio imina (<4%), producto compuesto **vii** (>93%) y aducto de Michael de bencilamina (no detectado). En el tiempo de reacción de 5,5 h, la reacción se consideró completa. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con acetato de etilo (3,0 l). La mezcla se dividió por la mitad para su procesamiento debido al gran volumen involucrado.

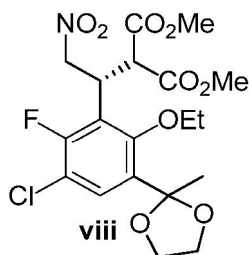
Cada mitad se trató de acuerdo con el siguiente procedimiento: La mezcla de la reacción se lavó primero con NaCl 1,5 M en agua (2 x 1500 ml; después de cada lavado, la producción de volumen acuoso aumentó en comparación con la entrada, lo que sugiere que se estaban eliminando el ácido acético y/o el nitrometano.). Luego, la mezcla se enfrió a aproximadamente 15°C y se lavó con una solución acuosa de NaOH 4 M (4 x 300 ml) hasta que el extracto acuoso alcanzó un pH de 8-9. Durante los lavados iniciales, la capa acuosa permaneció ácida, pero a medida que la acuosa se volvió ligeramente básica durante los lavados posteriores, la mezcla se calentó y el extracto se volvió oscuro. Las capas se separaron. La capa orgánica después del ajuste de pH se lavó luego con cloruro de sodio 1,5 M en agua (1000 ml) y agua (500 ml). Se observaron emulsión y partición lenta durante estos lavados finales. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El jarabe color ámbar resultante se colocó a vacío alto durante la noche. El jarabe solidificó y se obtuvieron 740 g de producto bruto.

Se añadió heptano (1,3 l) al producto bruto, formando una lechada, que se calentó en un baño de agua a 60° C hasta que se disolvieron todos los sólidos. La solución resultante se filtró para pulir en un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 3 l limpio equipado con un agitador superior y entrada de nitrógeno. El filtro se enjuagó con heptano (40 ml). La solución filtrada se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 5 h. Se observaron precipitados sólidos y la suspensión se enfrió a 0° C en un baño de hielo durante 1 h. El producto se recogió por filtración y la torta húmeda resultante se lavó con 500 ml de heptano enfriado con hielo. El producto se secó parcialmente sobre el filtro bajo succión al vacío y se secó adicionalmente bajo vacío alto durante la noche. El filtrado y la solución de lavado se concentraron a presión reducida y el residuo resultante se mantuvo para purificación en columna.

Los sólidos de la cristalización de heptano se disolvieron en un pequeño volumen de DCM y EtOAc/hexano al 20% y se cargaron en una columna que contenía aproximadamente 1 kg de gel de sílice. La columna se eluyó con EtOAc/hexano al 20%. Las fracciones deseadas se combinaron y concentraron a presión reducida para dar un sólido amarillo. El sólido se secó a vacío alto durante la noche para dar 497 g del producto compuesto **vii** como un sólido cristalino amarillo pálido.

El filtrado concentrado y el lavado de la cristalización de heptano se cargaron en la misma columna que antes usando EtOAc/hexano al 20%. La columna se eluyó usando el mismo sistema solvente que antes para eliminar las impurezas de la referencia y el ácido acético residual. Las fracciones deseadas se combinaron y concentraron a presión reducida para dar un aceite color ámbar rojizo. El aceite se colocó a vacío alto y se obtuvieron aproximadamente 220 g de producto bruto. Este producto bruto se disolvió en heptano (500 ml) y se sembró con una pequeña cantidad del producto sólido de la primera cosecha. La lechada se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y luego se enfrió en un baño de hielo durante 3 h. El segundo producto de cosecha se recogió mediante filtración. El producto se secó a vacío alto y se obtuvieron 110 g de producto en forma de un sólido amarillo. La cantidad total de producto compuesto **vii** obtenido fue de 607 g (rendimiento del 93,3%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.94 (s, 2H), 7.68 (d, J=8.9 Hz, 1H), 4.07-3.95 (m, 4H), 3.82-3.73 (m, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.39 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₄H₁₆ClFNO₅ (M+H)⁺: m/z=332.0.

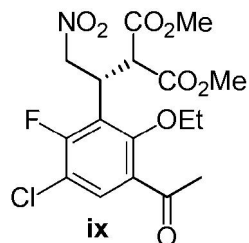
Paso 7. (R)-dimetil-2-(1-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil)-2-nitroetil)malonato (viii)



En un matraz de fondo redondo de 2 l con barra de agitación magnética y entrada de nitrógeno que contenía (E)-2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-(2-nitrovinil)fenil)-2-metil-1,3-dioxolano (**vii**, 352,8 g, 1064 mmol) se añadió tetrahidrofurano anhidro (1,06 l) y malonato de dimetilo (146 ml, 1280 mmol). Se cargó (1S,2S)-NN'-dibencilciclohexano-1,2-diamina-dibromoníquel (Catalizador de Evans, 21,4 g, 26,6 mmol) a la mezcla de la reacción. La mezcla de la reacción era de color marrón y se observó una solución homogénea. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18,5 h. La reacción se analizó después de 18,5 h mediante HPLC. El material de partida sin reaccionar, compuesto vii, estaba presente al 2%. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida para eliminar el THF y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (DCM/hexanos usados para la carga, se usaron 1422 g de gel de sílice para esta columna y la columna se eluyó con EtOAc/hexano del 10% al 20%; las fracciones de la columna se monitorizaron mediante TLC usando EtOAc/hexano al 30% como eluyente y se visualizaron mediante UV). Las fracciones deseadas se combinaron y concentraron a presión reducida. El residuo se secó a vacío alto. Con el tiempo, el jarabe se solidificó a sólidos amarillo claro (503,3 g) y se tomó una muestra para análisis por HPLC quiral. La pureza quiral era del 95,7% del enantiómero (R) deseado y del 4,3% del enantiómero (S) no deseado. Se añadió etanol (1,0 l) a los sólidos y la mezcla se calentó en un baño de agua a 60° C hasta que se disolvieron los sólidos. La solución se filtró para pulir en un fondo redondo de 4 bocas de 3 l limpio a través de papel de filtro Whatman N° 1. La solución filtrada se enfrió a temperatura ambiente mientras se agitaba. Se observó cristalización después de 30 min de agitación y la lechada se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La lechada se enfrió en un baño de hielo durante 1 h. El producto se recogió por filtración y la torta de filtración resultante se lavó con etanol helado (500 ml) y se secó parcialmente sobre el filtro. Los sólidos se secaron a vacío alto para dar el producto **viii** deseado (377,5 g) como sólidos cristalinos blancos. Se determinó mediante HPLC quiral que la pureza quiral era del 100% del enantiómero (R) deseado y del 0% del enantiómero (S) no deseado.

El filtrado y el lavado se combinaron y se concentraron a presión reducida hasta un aceite (118,9 g). El aceite se disolvió en etanol (475,0 ml) (4 ml/g) y se sembró con los cristales de la primera cosecha. La lechada resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente y luego se enfrió en un baño de hielo durante 5,5 h. El segundo producto de cosecha se aisló por filtración y se secó parcialmente sobre el filtro. Se secó a vacío alto para dar el segundo producto de cosecha (31,0 g). Se determinó por HPLC quiral que la pureza quiral era del 98,3% del enantiómero (R) deseado y del 1,7% del enantiómero (S) no deseado. El rendimiento combinado de la primera y segunda cosecha de producto fue de 408,5 g con un rendimiento del 82,8%. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.51 (d, J=9.0 Hz, 1H), 5.20-4.81 (m, 2H), 4.62 (m, 1H), 4.14-4.03 (m, 2H), 4.03-3.97 (m, 2H), 3.95-3.88 (m, 1H), 3.84-3.72 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.39 (t, J=6.9 Hz, 3H). LCMS para C₁₉H₂₄ClFO₉ (M+H)⁺: m/z=463.9.

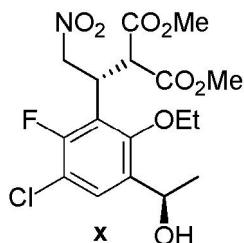
Paso 8. 2-(1-(3-acetil-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)-2-nitroetil)malonato de (R)-dimetilo (**ix**)



A una solución agitada de (R)-dimetil-2-(1-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil)-2-nitroetil)malonato (**viii**, 244,0 g, 526,0 mmol) en acetona (1,2 l) en un matraz de fondo redondo de 5 l de tres bocas, equipado con un agitador mecánico, se añadió yodo (13,4 g, 52,6 mmol) a temperatura ambiente. La solución marrón resultante se calentó a 50° C en un baño de agua durante 30 min, momento en el que el análisis LCMS mostró que la reacción se había completado. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se inactivó con una solución de tiosulfato de sodio (17,0 g, 108 mmol) en agua (160 ml) para dar una solución transparente amarillo pálido. En este momento, se cargó una cantidad adicional de agua (1,2 l) a la solución inactivada y la lechada blanca resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, el sólido se recogió mediante filtración y se volvió a disolver en acetona (1,4 l) a 40° C. La solución se enfrió a temperatura ambiente y

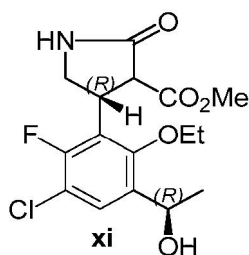
luego se añadió agua adicional (1,4 l). La lechada blanca resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El sólido se recogió por filtración y se lavó con agua (3 x 100 ml). El producto sólido se secó en un embudo de filtración bajo succión con un flujo de nitrógeno durante 46 h para dar el compuesto **ix** como un sólido blanco (212 g, rendimiento del 96%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (d, J=8.6 Hz, 1H), 5.09-4.67 (m, 3H), 4.10-3.83 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 1.46 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₇H₂₀ClFNO₈ (M+H)⁺: m/z=420.1.

Paso 9. 2-((R)-1-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)-2-nitroetil)malonato de dimetilo (x)



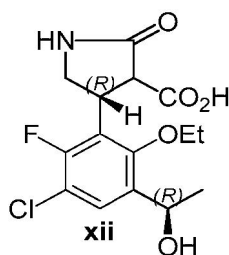
A una solución agitada de (3a,S)-1-metil-3,3-difeniltetrahydro-3H-pirrol[1,2-c][1,3,2]oxazaborol, ((S)-MeCBS, 16,39 g, 59,12 mmol, 0,1 eq.) En THF anhidro (100 ml) en un matraz de fondo redondo de 5 l a temperatura ambiente, se le añadió una solución de complejo de borano-THF 1,0 M en THF (591 ml, 591 mmol, 1 eq.) seguido de eterato de trifluoruro de boro (3,75 ml, 29,6 mmol, 0,05 eq). La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se añadió gota a gota una solución de [(1R)-1-(3-acetil-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)-2-nitroetil]malonato de dimetilo (**ix**, 253,0 g, 591,2 mmol) en THF anhidro (1,7 l) mediante un embudo de adición durante 60 min. El matraz que contenía la cetona **ix** se enjuagó con THF anhidro (135 ml) y la solución se añadió gota a gota mediante el embudo de adición a la mezcla de la reacción. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 10 min adicionales, momento en el que el análisis LCMS mostró la conversión completa de la cetona en alcohol. La reacción se inactivó mediante la adición gota a gota de metanol (71,8 ml, 1770 mmol) a 0°C. La mezcla de la reacción inactivada se agitó a temperatura ambiente durante 15 min antes de concentrarse al vacío para dar el producto bruto. Los productos brutos de este lote y un lote similar (usando 200 g de material de partida) se combinaron y se purificaron por cromatografía en columna de gel de sílice usando del 0 al 5% de MeOH/DCM como eluyente para dar el compuesto **x** como un sólido blanco (437 g, rendimiento del 97,9%). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.50 (d, J=8.8 Hz, 1H), 5.13 (q, J=6.3 Hz, 1H), 5.01-4.65 (m, 3H), 4.14-3.89 (m, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.57 (s, 3H), 1.57-1.42 (m, 6H). LCMS para C₁₇H₂₁ClFNNaO₈ (M+Na)⁺: m/z=444.0.

Paso 10. 4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)-2-oxopirrolidin-3-carboxilato de (4R)-metilo (xi)



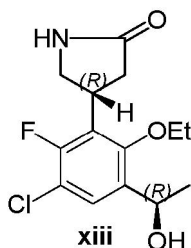
Un matraz de fondo redondo Morton de 3 bocas que contenía ((1R)-1-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)-2-nitroetil)malonato de dimetilo (**x**, 100,0 g, 237,1 mmol) en tetrahidrofurano (800,0 ml) y níquel Raney (120 g después de eliminar el agua con una pipeta) se equipó con un condensador, un agitador mecánico (varilla de agitación de vidrio y rodamiento de teflón) y dos globos de gas de hidrógeno (después de la purga al vacío). El matraz se colocó en un baño de aceite a 65° C. El lote se agitó vigorosamente durante 16 horas y los globos se retiraron periódicamente y se volvieron a llenar con hidrógeno. Se tomó una muestra y se analizó por HPLC. El producto, compuesto **xi**, estaba presente al 83%. Había 7,8% de amina no ciclada y 5,5% de subproducto de hidroxilamina en la mezcla de la reacción. El catalizador se eliminó por filtración (debe tenerse cuidado de no permitir que el níquel Raney se seque para exponerlo al aire). El filtrado se evaporó hasta la sequedad para dar 91 g de producto bruto como una espuma blanca. El producto bruto (91 g, pureza del área del 82,6%) se combinó con otro lote similar de producto bruto (93 g, pureza del 72,8%) para la purificación. El producto bruto combinado (184 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc/hexano como eluyente) para dar el compuesto **xi** (101,1 g, pureza por HPLC del 93%, rendimiento bruto del 59,3%). El material bruto se usó para el siguiente paso sin purificación adicional. LCMS para C₁₆H₂₀ClFNO₅ (M+H)⁺: m/z=360.0.

Paso 11. Ácido (4R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)-2-oxopirrolidin-3-carboxílico (xii)



En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 5 l equipado con un agitador superior y una entrada de nitrógeno se cargó una solución de 4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)-2-oxopirrolidin-3-carboxilato de (R)-metilo (**xi**, 268 g, 581 mmol) en tetrahidrofurano (2150 ml, 26500 mmol). A la solución se le cargó hidróxido de sodio 1,0 M en agua (1420 ml, 1420 mmol). La solución turbia resultante se volvió transparente en 1 min. La mezcla de la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se analizó por LCMS después de 15 horas y pareció completarse ya que no se observó el material de partida. La mezcla de la reacción se enfrió en un baño de hielo a una temperatura interna de 9,5°C y la mezcla se acidificó a pH 1-2 mediante la adición de ácido clorhídrico acuoso 6,0 M (237,0 ml, 1422 mmol) mediante un embudo de goteo durante 30 min. La mezcla de la reacción se dividió por la mitad y cada mitad se extrajo con acetato de etilo (2 x 1 l). Las capas acuosas combinadas se extrajeron adicionalmente con acetato de etilo (500 ml). Las dos capas orgánicas se lavaron con salmuera (20% p/p de NaCl/agua, 2 x 1000 ml), se secaron sobre MgSO₄ anhidro, se filtraron y se concentraron para dar el ácido intermedio **xii** bruto como una espuma amarillenta que se usó directamente en la siguiente reacción. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.68 (br s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.52 (d, J=8.0 Hz, 1H), 5.27 (br s, 1H), 4.90 (q, J=6.3 Hz, 1H), 4.28 (q, J=8.8 Hz, 1H), 3.92-3.81 (m, 1H), 3.76-3.65 (m, 1H), 3.57 (t, J=9.6 Hz, 1H), 3.46 (d, J=9.4 Hz, 1H), 3.23 (q, J=9.5 Hz, 1H), 1.33 (t, J=6.9 Hz, 3H), 1.28 (d, J=6.4 Hz, 3H). LCMS para C₁₅H₁₇ClFNO₅ (M+Na)⁺: m/z=368.0.

Paso 12. (R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)pirrolidin-2-ona (xiii)



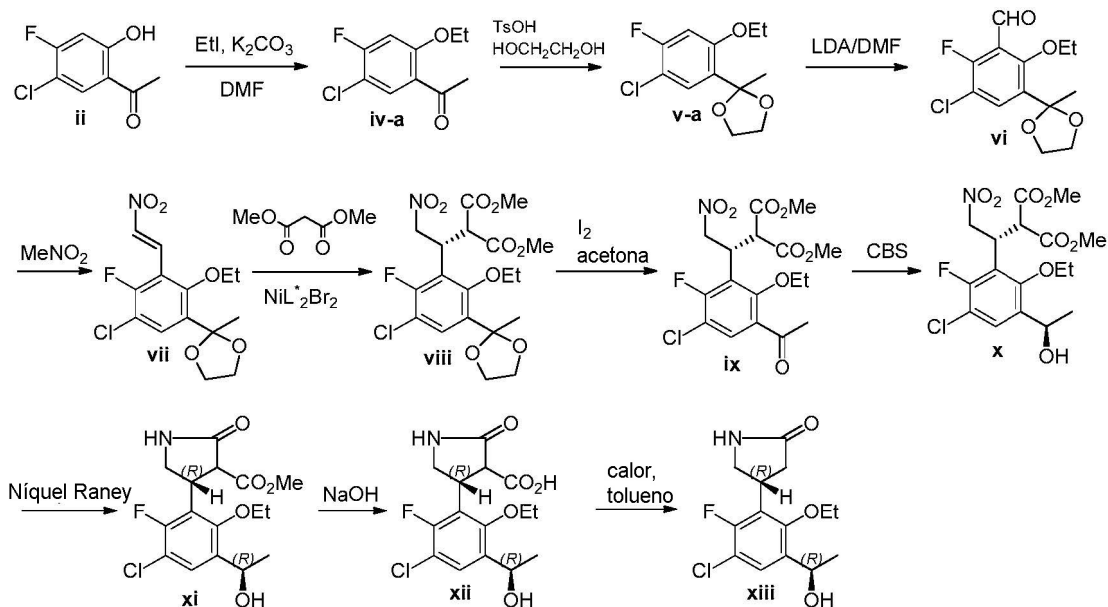
El compuesto **xii** bruto se disolvió en 1,4-dioxano (976 ml) y tolueno (976 ml) y la solución amarilla resultante se calentó a 100° C. El color de la solución se volvió marrón a medida que avanzaba la reacción. Las muestras se extrajeron en puntos temporales de 1 h, 2 h y 2,5 h. A las 2,5 h, el análisis por HPLC mostró que el ácido, compuesto **12**, estaba al 0,38% y el producto deseado, compuesto **xiii**, al 78,8%. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró por pulido en un matraz limpio de fondo redondo de 3 l. Luego, la solución se concentró a presión reducida y el residuo resultante se colocó a vacío alto para dar una espuma marrón (254 g).

Se cargó acetonitrilo (350 ml) en el jarabe marrón y se calentó en un baño de agua a 65° C hasta que se observó la disolución. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 16 h. Los sólidos se separaron de la solución. La lechada resultante se enfrió en un baño de hielo durante 1 h. El producto se recogió por filtración y la torta del filtro se enjuagó con 400 ml de acetonitrilo enfriado con hielo. Los sólidos parecían ser higroscópicos. El sólido se disolvió en DCM (2,0 l) y se concentró hasta un jarabe que se colocó a vacío alto para producir el compuesto **xiii** como una espuma blanca (106,4 g).

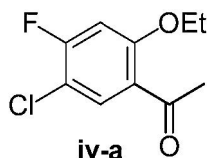
El filtrado se concentró hasta un jarabe oscuro (aproximadamente 120 g) que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (4 columnas de gel de sílice de 330 g, cargadas con DCM, eluidas con del 50% al 100% de EtOAc/hexano, y monitorizadas por TLC usando 100% de EtOAc como eluyente). Las fracciones de la cromatografía se concentraron a presión reducida y se colocaron a vacío alto para producir una espuma de color marrón claro (54,4 g). La espuma se cargó con MTBE (400 ml) y MeOH (10 ml) y se calentó en un baño de agua a 56° C durante 15 minutos y quedaron algunos sólidos. La lechada se enfrió a temperatura ambiente con agitación. La lechada se filtró para eliminar las sustancias insolubles. El filtrado se concentró a un jarabe y se colocó a vacío alto para producir una espuma. La espuma se cargó con acetonitrilo (72 ml, 1,5 ml/g) y se calentó en un baño de agua a 60°C hasta que la solución se volvió homogénea. La solución se enfrió a temperatura ambiente con agitación y los sólidos precipitaron de la solución y se volvieron muy espesos. Se cargó acetonitrilo adicional (24 ml) para ajustar la dilución a 2 ml/g. La lechada se agitó a temperatura ambiente durante 16 h y luego se enfrió en un baño de hielo durante 1 hora. El producto se recogió por filtración y se enjuagó con acetonitrilo. Se obtuvo el compuesto **xiii**

(25 g) como segunda cosecha. Se obtuvieron un total de 131,4 g del compuesto **xiii** con un rendimiento del 74,9% a partir del compuesto **xi**. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.83 (s, 1H), 7.47 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 5.24 (d, $J=4.5$ Hz, 1H), 4.96-4.85 (m, 1H), 4.08-3.92 (m, 1H), 3.80 (qt, $J=6.9$, 3.5 Hz, 2H), 3.61-3.51 (m, 1H), 3.25 (t, $J=9.1$ Hz, 1H), 2.61-2.50 (m, 1H), 2.35-2.26 (m, 1H), 1.33 (t, $J=7.0$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J=6.4$ Hz, 3H). LCMS para $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{ClFNO}_3$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: $m/z=302.0$.

Ejemplo 2. Síntesis alternativa de (R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)pirrolidin-2-ona

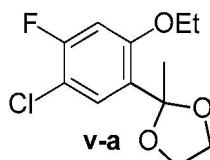


Paso 1. 1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)etanona (**iv-a**)



Se mezclaron 1-(5-cloro-4-fluoro-2-hidroxifenil)etanona (Compuesto **ii** del ejemplo 1, paso 1, 1350 g, 7160 mmol), N,N-dimetilformamida (3,32 l), yodoetano (1340 g, 8590 mmol) y carbonato de potasio (1980 g, 14300 mmol) y se agitaron a temperatura ambiente durante 45 min. La temperatura del lote subió a 55° C desde 22° C. La mezcla de la reacción se calentó a 60° C durante 1 h (la temperatura del lote alcanzó 67° C en 30 min y luego bajó a 60° C). El análisis HPLC indicó que se consumió todo el material de partida. Se añadió agua (10 l) en una porción (la agitación cesará si se añade agua en porciones). La lechada resultante se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. El producto se recogió por filtración y se lavó con agua (3 l). El producto se secó sobre el filtro al vacío durante 5 días para dar el compuesto **iv-a** como un sólido de color tostado (1418 g). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.69 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J=11.6$ Hz, 1H), 4.15 (q, $J=7.0$ Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.37 (t, $J=7.0$ Hz, 3H).

Paso 2. 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)-2-metil-1,3-dioxolano (**va**)

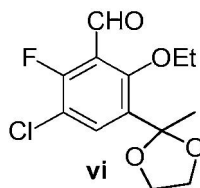


Se disolvió una solución de 1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)etanona (**iv-a**, 1481,0 g, 6836,3 mmol) en tolueno (6 l). Se añadieron a la solución 1,2-etanodiol (953 ml, 17100 mmol) y monohidrato de ácido *p*-toluenosulfónico (104 g, 547 mmol). La mezcla de la reacción se calentó a reflujo a 104-110° C con el uso de una trampa Dean-Stark para eliminar el agua durante 17,4 h. El análisis de HPLC indicó que el 37% del material de partida permaneció sin reaccionar. Se eliminaron aproximadamente 600 ml de destilado y la mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 5 h adicionales (22 h en total). El análisis por HPLC indicó que no hubo reacción adicional.

Se especuló que el K_2CO_3 residual en el material de partida compuesto **iv-a** puede haber detenido la reacción. Por tanto, la mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1 N (3 x 6,66 l). Después del lavado con ácido acuoso, la capa orgánica se transfirió de nuevo al recipiente de reacción. Se añadieron 1,2-etanodiol (381 ml, 6840 mmol) y monohidrato de ácido *p*-toluenosulfónico (104 g, 547 mmol) y la mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 16 h. El análisis por HPLC indicó que aproximadamente el 20% del material de partida permaneció sin reaccionar. Se eliminaron aproximadamente 100 ml de destilado. Se añadió 1,2-etanodiol (380 ml, 6800 mmol) y se calentó a reflujo durante 6 h (22 h en total). La HPLC indicó que el 7% del material de partida permaneció sin reaccionar. Se eliminaron aproximadamente 125 ml de destilado. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 6 h (total 28 h). La HPLC indicó que el 5,4% del material de partida permaneció sin reaccionar. Se eliminaron aproximadamente 125 ml de destilado. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo durante 7 h adicionales. El análisis de HPLC indicó que el 3,5% del material de partida permaneció sin reaccionar. Se eliminaron aproximadamente 80 ml de destilado. La reacción se consideró completa en este punto.

La mezcla de la reacción se lavó con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N (2 x 5,5 l). El primer lavado básico se extrajo con tolueno (2,1 l). La solución de tolueno combinada se lavó con agua (7 l) y se concentró para dar 2153 g de aceite oscuro. El análisis por HPLC indicó una pureza del producto al 93,8% con un 1,90% de material de partida y un 0,79% de producto de desyodo. El análisis por 1HMR indicó que permanecieron en el producto aproximadamente 0,5 equivalentes de tolueno (aproximadamente 256 g). El rendimiento corregido de compuesto **v-a** fue del 88,0%. 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.51 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 6.70 (d, $J=11.0$ Hz, 1H), 4.17-3.92 (m, 4H), 3.91-3.80 (m, 2H), 1.75 (s, 3H), 1.46 (t, $J=7.0$ Hz, 3H).

Paso 3. 3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)benzaldehído (vi)



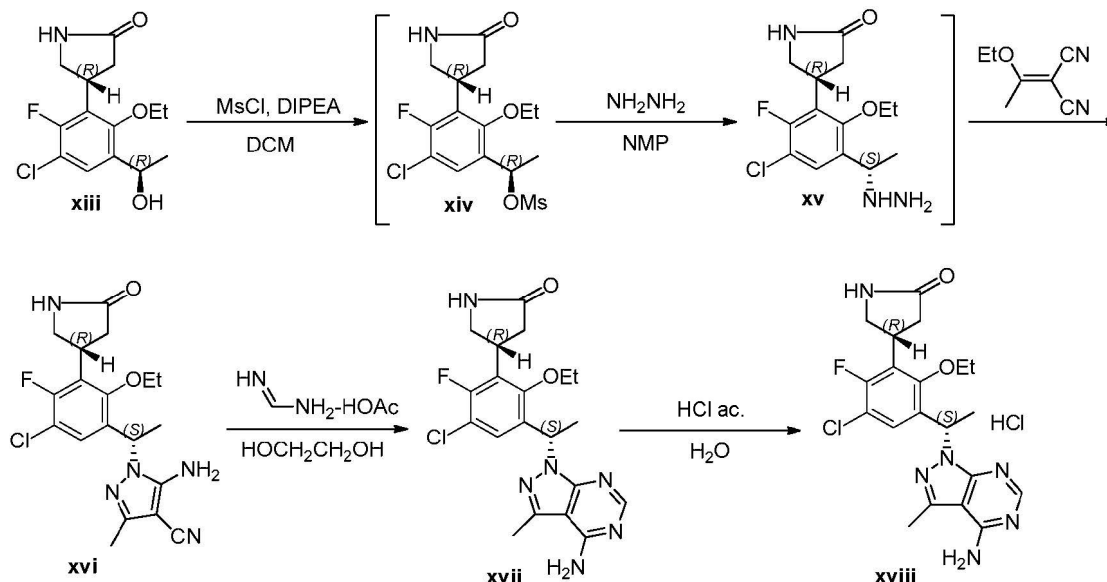
Se cargó N,N-diisopropilamina (87,8 ml, 626 mmol) y tetrahydrofurano anhidro (1090 ml, 13500 mmol) en un matraz de fondo redondo de 4 bocas de 3 l secado al horno equipado con un agitador superior, un embudo de adición de 500 ml, entrada de nitrógeno, tabiques y termopar. Esta solución se enfrió a $-72^\circ C$ y se cargó con 2,5 M de *n*-butillitio en hexanos (261 ml, 652 mmol). La solución de *n*-butillitio se añadió durante 18 min. La temperatura interna máxima durante la adición fue de $-65^\circ C$. El baño de hielo seco-acetona se reemplazó por un baño de agua con hielo y la mezcla de la reacción se calentó a aproximadamente de $-5^\circ C$ a aproximadamente $0^\circ C$ y se mantuvo durante 15 min. Luego, la mezcla de la reacción se enfrió a $-74,5^\circ C$.

A un matraz de fondo redondo de 1 l separado que contenía 2-(5-cloro-2-etoxi-4-fluorofenil)-2-metil-1,3-dioxolano (**v-a**, 136,1 g, 522,1 mmol) se añadió tetrahydrofurano anhidro (456 ml) para disolver los sólidos. La solución resultante se enfrió en un baño de hielo a aproximadamente $0^\circ C$. La solución que contenía el compuesto **v-a** se transfirió a la solución de LDA durante 40 minutos mediante una cánula mientras se mantenía la temperatura de reacción entre $-70^\circ C$ y $-72,5^\circ C$. La mezcla de la reacción se volvió una lechada amarilla y se agitó durante 37 min a $-74^\circ C$. Se cargó N,N-dimetilformamida (60,6 ml, 783 mmol) en una porción mediante una jeringuilla y esta adición produjo una exotermia de $-74,5^\circ C$ a $-66,5^\circ C$. La reacción se monitorizó por HPLC a los 90 minutos después de la adición. El material de partida estaba presente al 2,9%. Se retiró el baño frío y se calentó la mezcla de la reacción a temperatura ambiente. Se tomaron muestras de la mezcla de la reacción y se analizaron después de 3 horas y el material de partida sin reaccionar estaba presente al 1,5%. La reacción se consideró completa y se inactivó mediante la adición de la solución de reacción a agua con hielo (1,4 l) y se diluyó con acetato de etilo (1,5 l). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (1,5 l) y las capas orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera (20% p/p de NaCl acuoso, 2 x 600 ml) y se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro. El $MgSO_4$ se eliminó por filtración y el filtrado se concentró a un aceite con algunos sólidos presentes. Este residuo se disolvió en cloruro de metileno y se cargó en una almohadilla de gel de sílice (586 g). La almohadilla de sílice se eluyó con EtOAc/DCM al 2% (monitorizado por TLC usando DCM al 100% como eluyente). Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron a presión reducida para dar un aceite de color ámbar claro. El aceite se colocó a vacío alto para dar el compuesto **vi** como un sólido amarillo (146,5 g, rendimiento del 95,1%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.27 (s, 1H), 7.78 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 4.10-3.96 (m, 4H), 3.87-3.76 (m, 2H), 1.72 (s, 3H), 1.44 (t, $J=7.0$ Hz, 3H). LCMS para $C_{13}H_{15}ClFO_4$ ($M+H$) $^+$: $m/z=289.1$.

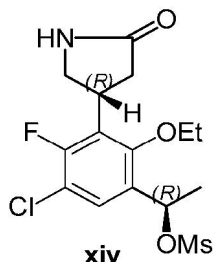
Pasos 4-10. (R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxietil)fenil)pirrolidin-2-ona (xiii)

El compuesto del título se preparó usando procedimientos análogos a los descritos en el Ejemplo 1, Pasos

6-12.

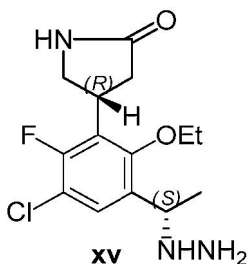
Ejemplo 3. Clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona

Paso 1. (R)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etilmetanosulfonato (xiv)



Se disolvió (R)-4-(3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((R)-1-hidroxi-3-etil)fenil)pirrolidin-2-ona (xiii, 172,0 g, 570,0 mmol) (consistía en 147 g al 99,83%: 0,09% de pureza quiral, 99,33% de pureza química; y 25 g, 87,46%: 12,54% de pureza quiral, 86,74% de pureza química) en cloruro de metileno (860 ml). Se añadió N,N-diisopropiletilamina (149 ml, 855 mmol) a la solución a una temperatura de aproximadamente -7°C . Se añadió gota a gota cloruro de metanosulfonilo (57,4 ml, 741 mmol) a la mezcla de la reacción durante 25 min. La suspensión se volvió una solución transparente. En el punto temporal de reacción de 30 min, la HPLC indicó que la reacción se había completado. Esta mezcla de la reacción que contiene el compuesto xiv se usó directamente en la siguiente reacción.

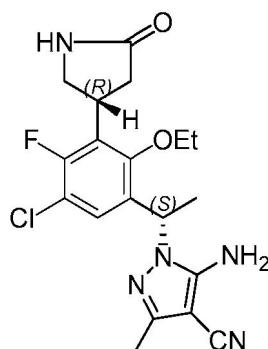
Paso 2. (R)-4-(S-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-((S)-1-hidraziniletil)fenil)pirrolidin-2-ona (xv)



A 0°C , se añadió hidrazina (178,9 ml, 5,7 mol) en una porción seguida de N-metilpirrolidinona (860 ml) a la mezcla de la reacción que contenía el compuesto xiv del Paso 1. La mezcla de la reacción se volvió turbia y se formaron algunos precipitados. La mezcla se calentó a $40\text{--}57^\circ\text{C}$ bajo nitrógeno durante 90 min. La HPLC indicó que se había consumido todo el mesilato.

La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadió una solución saturada de bicarbonato de sodio (28,3 g) en agua (300 ml). La mezcla se agitó durante 20 min, momento en el que se añadió diclorometano (300 ml). La capa orgánica se separó y se agitó con una solución de bicarbonato de sodio (14,2 g) en agua (150 ml). La capa acuosa se extrajo con diclorometano (200 ml x 2). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (80 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro (311 g), se concentraron y se destilaron azeotrópicamente con tolueno (250 ml) para dar una solución de N-metilpirrolidinona incolora que contenía el compuesto **xv** que se usó directamente en la siguiente reacción. Se purificó una muestra para análisis de NMR. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), δ 7.88 (s, 1H), 7.66 (d, J=8.5 Hz, 1H), 4.42 (q, J=6.7 Hz, 1H), 4.06-3.88 (m, 2H), 3.79-3.66 (m, 1H), 3.65-3.51 (m, 1H), 3.24 (t, J=8.8 Hz, 1H), 2.60-2.46 (m, 1H), 2.36-2.25 (m, 1H), 1.37 (t, J=6.9 Hz, 3H), 1.26 (d, J=6.8 Hz, 3H). LCMS para C₁₄H₁₉ClFN₃O₂(M+H)⁺: m/z=316.1.

Paso 3. 5-amino-1-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (**xvi**)



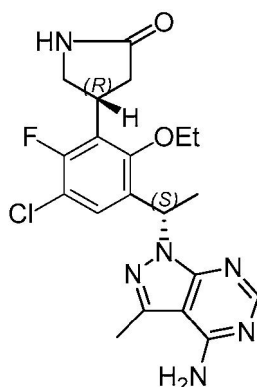
xvi

Con agitación, se añadió (1-etoxietiliden)malononitrilo (101 g, 741 mmol) a la solución en N-metilpirrolidinona del compuesto **xv** del Paso 2, en porciones y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Después de 15 min, el análisis por HPLC indicó un 11% de material de partida de hidrazina, compuesto **xv**, con respecto al producto compuesto **xvi**. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (15 ml, 86 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. El análisis por HPLC indicó que quedaba un 5,6% de material de partida. Se añadió N,N-diisopropiletilamina (5 ml, 30 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. La HPLC indicó que quedaba un 5,6% de material de partida. La mezcla de la reacción se agitó durante 2,5 días y se combinó con dos lotes similares y se trataron juntos.

Se combinaron las mezclas de reacción de tres lotes del compuesto **xvi**. Se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio 0,5 M (3,8 l) a 10-20° C y se agitó durante 5 min. La HPLC indicó que se había consumido todo el material de partida (1-etoxietiliden)malononitrilo. Se añadió acetato de etilo (4,0 l) y la mezcla se agitó durante 15 min. Las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con hidróxido de sodio 0,5 M en agua (2,38 l). Las capas se separaron. La capa acuosa combinada se extrajo con acetato de etilo (2 x 2 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con ácido clorhídrico acuoso 1,0 M (3,56 l) y el pH de la capa acuosa resultante fue de 2-3. La capa orgánica se lavó con salmuera (5 l), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se concentró y se secó a vacío alto durante 40 h para dar el compuesto **xvi** en forma de un sólido espumoso de color marrón claro (702,7 g). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7.78 (s, 1H), 7.44 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.53 (s, 2H), 5.64 (q, J=6.7 Hz, 1H), 3.96 (m, 1H), 3.74 (m, 1H), 3.34 (m, 1H), 3.58 (m, 2H), 2.59-2.50 (m, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.57 (d, J=6.8 Hz, 3H), 1.37 (t, J=6.9 Hz, 3H). LCMS para C₁₉H₂₂ClFN₅O₂(M+H)⁺: m/z=406.1.

Se calculó que el rendimiento total del compuesto **xvi** en tres pasos (mesilación, hidrazinolisis y formación de pirazol) era del 72,8% a partir de la entrada total del compuesto **xiii**. Se determinó por HPLC que la pureza era aproximadamente del 80%. El análisis por HPLC indicó que existía algo de producto en la capa acuosa básica que se extrajo posteriormente con EtOAc (2 l), se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1,0 M y salmuera, se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró y se secó en una bomba de vacío alto durante 40 h para proporcionar el compuesto **xvi** en forma de un aceite marrón (134 g, 13,9%).

Paso 4. (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-yrazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xvii**)

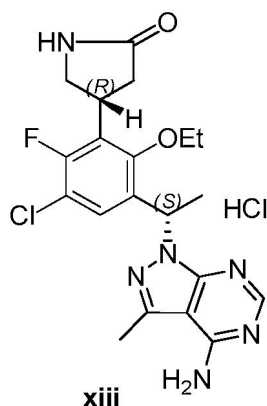


xvii

Se añadió 5-amino-1-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (**xvi**, 702,7 g, 1731 mmol) a un recipiente de reacción con acetato de formamidina (1802 g, 17,31 mol) y 1,2-etanodiol (3,51 l). La mezcla de la reacción se calentó a 102-103° C con agitación durante 18 h. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron acetato de etilo (7 l) y agua (6 l) y la mezcla bifásica se agitó durante 15 min. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se diluyó con agua adicional (4,5 l) y acetato de etilo (3 l) y se agitó durante 10 min. Se separó la capa orgánica. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (2 l). Las capas orgánicas se combinaron y se agitaron con agua (4,5 l). La capa acuosa se separó y la capa orgánica se filtró a través de una almohadilla de celite (aproximadamente 1 kg). La capa orgánica se extrajo con ácido clorhídrico acuoso 1,0 M (7 l) agitando la mezcla durante 10 min. Se separó la capa acuosa. La capa orgánica marrón claro se agitó con ácido clorhídrico acuoso 1,0 M adicional (3 l) durante 10 min. Se separó la capa acuosa. Las capas ácidas acuosas se combinaron y se lavaron con tolueno (500 ml). La solución ácida acuosa se enfrió con un baño de agua con hielo y se añadió cloruro de metileno (4 l). A 5-15° C, se añadió lentamente una solución de hidróxido de sodio (530 g) en agua (530 ml) (solución de NaOH al 50%) hasta un pH de solución de 11-12. Se observaron precipitados sólidos. Se añadieron más cloruro de metileno (3,5 l) y metanol (300 ml) y la mezcla se agitó durante 10-15 min. El producto sólido se recogió por filtración y se secó en el filtro bajo succión durante 16 h para dar el compuesto **xvii** (289,7 g) como un sólido marrón. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.11 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.52 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.30 (br s, 2H), 6.23 (q, J=7.0 Hz, 1H), 3.97 (p, J=9.2 Hz, 1H), 3.90-3.73 (m, 2H), 3.57 (t, J=9.9 Hz, 1H), 3.25 (dd, J=9.2, 8.7 Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.60-2.50 (m, 1H), 2.36-2.20 (m, 1H), 1.69 (d, J=7.1 Hz, 3H), 1.39 (t, J=6.9 Hz, 3H). LCMS para C₂₀H₂₃ClFN₆O₂ (M+H)⁺: m/z=433.3.

El filtrado se transfirió a un embudo de separación y se separó la capa orgánica. La capa acuosa se agitó con cloruro de metileno (5 l) y metanol (200 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se concentró, se secó en una bomba de vacío alto durante 16 h para dar una cantidad adicional de 259,3 g como un sólido marrón. El rendimiento total de **xvii** fue de 548,3 g con un rendimiento del 73,2%.

Paso 5. Sal de clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (xviii)



xviii

Se añadió una solución de ácido clorhídrico acuosa 1,0 M (HCl, 5,0 l, 5,0 mol) a (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xvii**, 609,8 g, 1,409 mol) a temperatura ambiente. La lechada espesa resultante se calentó luego a 50° C para proporcionar una solución transparente. Se añadieron 1,82 l adicionales de solución de ácido clorhídrico acuosa 1,0 M (HCl, 1,82 l, 1,82 mol; 6,82 l totales, 6,82 mol, 4,84 equiv.) a la solución transparente a 50° C y luego la solución se filtró a través de un filtro

de pulido aproximadamente a 50° C. La mezcla de la reacción filtrada con pulido enfrió gradualmente a temperatura ambiente durante 2 h antes de que se enfriase adicionalmente a 0-5°C. La mezcla de la reacción se agitó a 0-5° C durante por lo menos 20 min para iniciar la precipitación. Los sólidos resultantes se recogieron por filtración, se enjuagaron con una porción de solución madre fría, seguido de ácido clorhídrico acuoso 1,0 M (HCl, 200 ml), y se secaron en el embudo de filtración a temperatura ambiente bajo succión a peso constante (en aproximadamente 39 h) para producir la sal de ácido clorhídrico del compuesto de Fórmula I: Clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-i]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xviii**), 348,7 g, 661,2 g teóricos, 52,7%) como un polvo cristalino blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.39 (br s, 1H), 9.05 (br s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.59 (d, J=8.4 Hz, 1H), 6.28 (q, J=6.9 Hz, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.79 (m, 2H), 3.55 (m, 1H), 3.22 (m, 1H), 2.59 (s, 3H), 2.55 (ddd, J=16.8, 10.3, 2.3 Hz, 1H), 2.28 (ddd, J=16.8, 8.6, 1.5 Hz, 1H), 1.73 (d, J=7.0 Hz, 3H), 1.38 (t, J=6.9 Hz, 3H) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 175.3, 156.4 (J_{CF}=249.8 Hz), 153.8 (J_{CF}=7.0 Hz), 152.4, 150.8, 147.3, 144.3, 131.4 (J_{CF}=3.5 Hz), 127.3, 126.4 (J_{CF}=12.6 Hz), 116.1 (J_{CF}=18.4 Hz), 98.0, 72.1, 49.1, 46.6, 36.0, 29.4, 21.0, 15.4, 14.6 ppm. ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ -113.6 (d, J_{FF}=7.7 Hz) ppm. C₂₀H₂₃Cl₂FN₆O₂ (MW 469.34); LCMS (EI) m/e 433.2 (M+H; masa exacta de **xvii**: 432,15). Contenido de agua por KF: 3,63% en peso; contenido de cloruro (Cl⁻) por titulación: 7,56% en peso (7,56% teórico).

El intervalo de fusión/descomposición de la forma cristalina de la sal de clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona se determinó mediante DSC, desde una temperatura inicial de 30° C hasta una temperatura final de 350° C usando una tasa de calentamiento de 10° C/min. El termograma de DSC reveló un evento endotérmico con un inicio a 194,37° C y el pico a 206,55° C, como se muestra en la FIG 1.

El termograma de TGA mostró una pérdida de peso total del 4,3% hasta 210° C. Por encima de 210° C, la sal comienza a descomponerse, como se muestra en la FIG. 2.

En la FIG. 3 se muestra un patrón representativo de Difracción de Rayos X de Polvo (XRPD) y la Tabla 2 muestra los picos e intensidades correspondientes.

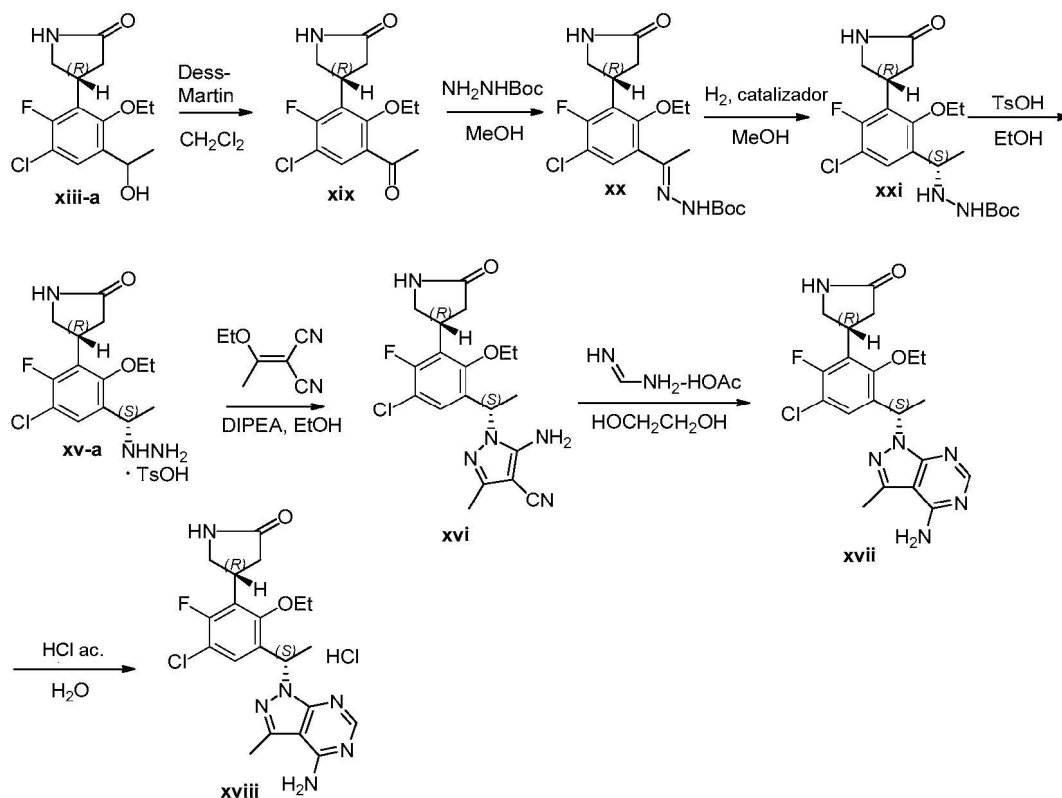
Tabla 2.

2-theta	Intensidad relativa	2-theta	Intensidad relativa	2-theta	Intensidad relativa
5.739	2.20%	25.098	2.20%	42.916	2.40%
7.133	1.20%	25.66	7.00%	43.373	0.50%
7.736	0.10%	25.895	4.00%	44.148	0.40%
10.225	2.30%	27.168	3.10%	45.29	0.30%
11.283	99.00%	27.792	8.50%	46.089	1.40%
11.303	94.10%	28.1	10.00%	47.572	0.40%
13.666	2.90%	28.464	5.50%	48.897	0.70%
14.166	0.90%	30.134	3.20%	49.647	0.50%
14.833	0.10%	31.239	13.70%	50.589	0.30%
15.364	3.80%	31.918	1.30%	51.042	0.10%
16.354	9.70%	32.827	9.50%	51.687	0.40%
17.136	0.50%	33.818	0.70%	52.624	0.40%
16.866	2.70%	34.198	2.80%	53.287	0.50%
17.435	5.50%	35.033	2.10%	54.104	0.20%
17.635	3.30%	35.423	2.10%	54.127	0.10%
18.811	5.10%	36.226	0.30%	54.159	0.20%
18.898	6.60%	36.676	0.90%	55.42	0.30%
19.603	1.50%	37.47	0.90%	56.821	0.10%

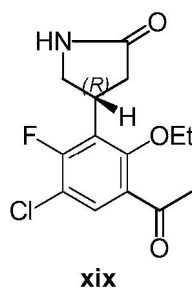
(continuación)

2-tetha	Intensidad relativa	2-tetha	Intensidad relativa	2-tetha	Intensidad relativa
20.157	1.80%	37.951	0.50%		
20.593	0.50%	38.457	1.70%		
21.039	11.10%	39.055	0.20%		
21.308	3.80%	39.968	0.20%		
22.169	7.50%	40.184	0.30%		
23.002	11.50%	40.962	0.20%		
24.628	6.60%	42	1.30%		

Ejemplo 4. Síntesis alternativa de clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona



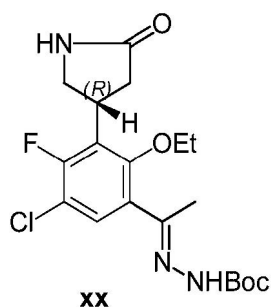
Paso 1. (R)-4-(3-acetil-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (xix)



Se disolvió (4R)-4-[3-cloro-6-etoxi-2-fluoro-5-(1-hidroxietil)fenil]pirrolidin-2-ona (como una mezcla de dos

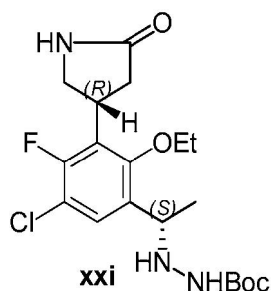
diastereómeros con configuración R en la pirrolidinona y configuraciones R o S en el alcohol secundario) (**xiii**, 16,7 g, 55,3 mmol) en diclorometano (167 ml). La solución se enfrió en un baño de agua con hielo y se añadió peryodinano de Dess-Martin (35,2 g, 83,0 mmol) en pequeñas porciones. La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, momento en el que el análisis por HPLC mostró que la reacción se había completado. Se añadió una solución de sulfito de sodio (28 g, 220 mmol) en agua (70 ml) a la mezcla de la reacción y la mezcla se agitó durante 20 min. Se añadió una solución de hidróxido de sodio 1,0 M a la mezcla y se agitó durante 10 min. Las capas se dejaron sedimentar y la capa orgánica se separó y se lavó secuencialmente con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 M (66 ml) y agua (60 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El agente de secado se eliminó por filtración y el filtrado se concentró para dar (R)-4-[3-acetil-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil]pirrolidin-2-ona como un aceite que se usó en el siguiente reacción sin purificación adicional.

Paso 2. 2-(1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-(5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etiliden)hidrazinacarboxilato de (R,E)-terc-butilo (xx)



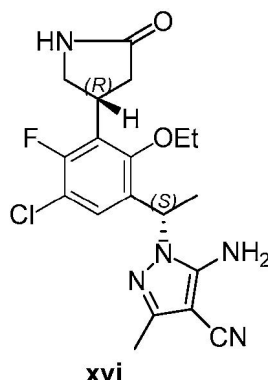
Se disolvió (R)-4-[3-acetil-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil]pirrolidin-2-ona bruta (compuesto **xix** del paso 1) en metanol (60 ml) y se añadió carbazato de t-butilo (8,04 g, 60,8 mmol) a la solución. La mezcla de la reacción se agitó a 65° C durante 3,5 días, momento en el que el análisis por HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla se concentró a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con una mezcla del 0-5% de metanol en acetato de etilo para dar 2-(1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-(5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etiliden)hidrazinacarboxilato de (R,E)-terc-butilo (**xx**, 19,5 g, 85%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 9.83 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.36 (d, J=8.6 Hz, 1H), 4.07 (p, J=9.1 Hz, 1H), 3.84-3.69 (m, 2H), 3.59 (t, J=9.5 Hz, 1H), 3.28 (t, J=9.5 Hz, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.25 (t, J=7.0 Hz, 3H). LCMS para C₁₉H₂₅ClFN₃NaO₄ (M+Na)⁺: m/z=436.1.

Paso 3. 2-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)hidrazinacarboxilato de terc-butilo (xxi)



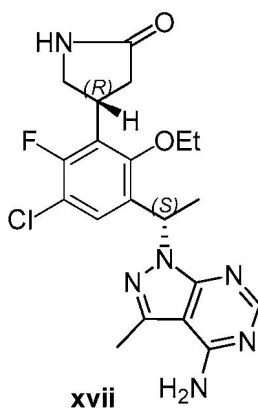
Se disolvió 2-(1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-(5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etiliden)hidrazinacarboxilato de (R,E)-terc-butilo (**xx**, 0,5 g, 1,2 mmol) en metanol (25 ml) y la solución se burbujeó con gas nitrógeno durante 5 min. Se añadieron Bis(1,5-ciclooctadieno)rodio(I)tetrafluoroborato (35 mg, 0,086 mmol) y (R)-(-)-1-((S)-2-[bis(4-trifluorometilfenil)fosfina]ferrocenil)etilo-di-t-butilfosfina (64 mg, 0,094 mmol) a la solución y la mezcla de la reacción resultante se burbujeó con gas nitrógeno durante 30 min. Luego, la mezcla de la reacción se agitó bajo una presión de gas hidrógeno (56 psi) durante 2,5 días. La mezcla de la reacción se concentró a presión reducida y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con una mezcla de metanol (0-10%) en acetato de etilo. Las fracciones deseadas se concentraron para dar 2-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)hidrazinacarboxilato de terc-butilo (**xxi**, 428 mg, 85% de rendimiento). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.18 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.53 (d, J=8.2 Hz, 1H), 4.73 (s, 1H), 4.41 (br s, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.75 (m, 2H), 3.61 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 2.29 (dd, J=17.6, 8.6 Hz, 1H), 1.32 (s, 12H), 1.10 (d, J=6.5 Hz, 1H). LCMS para C₁₉H₂₇ClFN₃NaO₄ (M+Na)⁺: m/z=437.9. El análisis de HPLC quiral indicó que el producto contenía el diastereómero deseado 2-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)hidrazina carboxilato de terc-butil (**xxi**) al 85,6% y el diastereómero no deseado 2-((R)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)hidrazina carboxilato de terc-butilo al 14,3%.

Paso 4. 5-amino-1-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (xvi)



Se añadieron 2-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)hidrazinacarboxilato de terc-butilo (**xxi**, 130 mg, 0,31 mmol) y monohidrato de ácido *p*-toluensulfónico (86 mg, 0,45 mmol) a etanol (3 ml) y la mezcla de la reacción se calentó a 50° C durante 20 h. El análisis de HPLC mostró que había aproximadamente un 88% de material de partida sin reaccionar. Se cargó una cantidad adicional de ácido *p*-toluenosulfónico (86 mg, 0,45 mmol) y la mezcla de la reacción se calentó a 60° C durante 24 h. El análisis por HPLC mostró una desprotección completa de Boc. Esta mezcla de la reacción se añadió con (1-etoxietiliden)malononitrilo (61 mg, 0,45 mmol) y N,N-diisopropiletilamina (260 µl, 1,5 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La HPLC mostró la finalización de la formación del anillo de pirazol. Se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio 1,0 M a la mezcla de la reacción y se agitó durante 20 min. Se añadió acetato de etilo (20 ml) a la mezcla y se agitó. Se dejó sedimentar la mezcla bifásica. Se recogió la capa de acetato de etilo y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (10 ml). La solución de acetato de etilo combinada se añadió con ácido clorhídrico acuoso 1 M (5 ml) y se agitó durante 15 min. Se dejó sedimentar la mezcla bifásica y se recogió la capa orgánica y se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El sulfato de sodio se eliminó por filtración y el filtrado se concentró para dar 5-amino-1-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (**xvi**, 126 mg, rendimiento cuantitativo de producto bruto) y se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Paso 5. (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xvii**)



Se añadió 5-amino-1-((S)-1-(5-cloro-2-etoxi-4-fluoro-3-((R)-5-oxopirrolidin-3-il)fenil)etil)-3-metil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (**xvi**, 126 mg, 0,31 mmol) con acetato de formamidina (323 mg, 3,1 mmol) y 1,2-etanodiol (2 ml). La mezcla de la reacción se calentó a 104-105° C con agitación. Luego de 18 h, el análisis por HPLC mostró que quedaba aproximadamente un 44% del compuesto **xvi** de material de partida. La mezcla de la reacción se calentó a 115° C durante 24 h. El análisis de HPLC mostró que la reacción se había completado. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron acetato de etilo (10 ml) y agua (5 ml). Se agitó la mezcla bifásica. Se permitió que las capas se separaran. Se recogió la capa orgánica y se extrajo la capa acuosa con acetato de etilo (5 ml). La solución de acetato de etilo combinada se lavó con agua (5 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro. El sulfato de sodio se eliminó por filtración y el filtrado se concentró hasta dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice. La columna se eluyó con una mezcla de metanol (0-5%) en cloruro de metileno. Las fracciones deseadas se combinaron y evaporaron para dar (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-

pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xvii**, 94 mg, rendimiento del 69,9%). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.11 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.52 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.30 (br s, 2H), 6.23 (q, J=7.0 Hz, 1H), 3.97 (p, J=9.2 Hz, 1H), 3.90-3.73 (m, 2H), 3.57 (t, J=9.9 Hz, 1H), 3.25 (dd, J=9.2, 8.7 Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 2.60-2.50 (m, 1H), 2.36-2.20 (m, 1H), 1.69 (d, J=7.1 Hz, 3H), 1.39 (t, J=6.9 Hz, 3H). LCMS para C₂₀H₂₃ClFN₆O₂ (M+H)⁺: m/z=433.3.

El análisis de HPLC quiral del producto indicó que contenía el diastereoisómero deseado, (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona (**xvii**), al 87% y el diastereoisómero no deseado (R)-4-(3-((R)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona al 13%.

Paso 6. Clorhidrato de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona

El producto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, Paso 5. La sal de clorhidrato resultante coincide bien con el material elaborado a partir del proceso sintético descrito en el Ejemplo 3, en todos los aspectos comparables, incluyendo las características de pureza química, pureza quiral y estado sólido.

Ejemplo A1: ensayo enzimático de PI3K

El kit de ensayo luminiscente de PI3-Quinasa que incluye sustrato de lípido quinasa, D-mio-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns (4,5)P₂)D (+)-sn-1,2-di-O-octanoilglicerilo, proteína detectora biotinilada I(1,3,4,5)P₄, PI(3,4,5)P₃ ligada a 3-O-fosfo (PIP₂), se adquirió de Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT). El kit de detección AlphaScreen™ GST, que incluye perlas donantes y aceptoras, se adquirió de PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA). PI3Kδ (p110δ/p85α) se adquirió de Millipore (Bedford, MA). ATP, MgCl₂, DTT, EDTA, HEPES y CHAPS se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Ensayo AlphaScreen™ para PI3Kδ

La reacción de la quinasa se realiza en una placa REMP de 384 pocillos de Thermo Fisher Scientific en un volumen final de 40 µl. Los inhibidores se diluyen primero en serie en DMSO y se añaden a los pocillos de la placa antes de la adición de otros componentes de reacción. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 2%. Los ensayos de PI3K se llevan a cabo a temperatura ambiente en HEPES 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 5 mM, NaCl 50 mM, DTT 5 mM y CHAPS 0,04%. Las reacciones se inician mediante la adición de ATP, la mezcla de la reacción final consistió de 20 µM de PIP₂, 20 µM de ATP, PI3Kδ 1,2 nM y se incuban durante 20 minutos. Luego, se transfieren 10 µl de la mezcla de la reacción a 5 µl de I(1,3,4,5)P₄ biotinilada 50 nM en tampón de inactivación: HEPES 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, DTT 5 mM, Tween-20 al 0,1%, seguido de la adición de 10 µl de perlas donantes y aceptoras AlphaScreen™ suspendidas en tampón de inactivación contiene proteína detectora PI(3,4,5)P₃ 25 nM. La concentración final de perlas tanto donantes como aceptoras es de 20 mg/ml. Después del sellado de la placa, la placa se incubó en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 2 horas. La actividad del producto se determina en un lector de microplacas Fusion-alpha (Perkin-Elmer). La determinación de IC₅₀ se realiza ajustando la curva del porcentaje de actividad de control frente al logaritmo de la concentración de inhibidor usando el software GraphPad Prism 3.0.

Ejemplo A2: Ensayo enzimático de PI3K

Materiales: sustrato de lípido quinasa, fosfoinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂), se adquirieron de Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT). Las isoformas α, β, δ y γ de **PI3K** se adquirieron de Millipore (Bedford, MA). ATP, MgCl₂, DTT, EDTA, MOPS y CHAPS se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Las reacciones de quinasa se llevan a cabo en una placa de 96 pocillos de fondo transparente de Thermo Fisher Scientific en un volumen final de 24 µl. Los inhibidores se diluyen primero en serie en DMSO y se añaden a los pocillos de la placa antes de la adición de otros componentes de la reacción. La concentración final de DMSO en el ensayo es del 0,5%. Los ensayos de PI3K se llevan a cabo a temperatura ambiente en MOPS 20 mM, pH 6,7, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM y CHAPS al 0,03%. La mezcla de la reacción se prepara conteniendo PIP₂ 250 µM, quinasa y concentraciones variables de inhibidores. Las reacciones se inician mediante la adición de ATP que contiene 2,2 µCi [γ-³³P]ATP hasta una concentración final de 1000 µM. La concentración final de las isoformas α, β, δ y γ de PI3K en el ensayo fueron 1,3, 9,4, 2,9 y 10,8 nM, respectivamente. Las reacciones se incuban durante 180 minutos y se terminan mediante la adición de 100 µl de fosfato de potasio 1 M pH 8,0, tampón de inactivación de EDTA 30 mM. A continuación, se transfiere una alícuota de 100 µl de la solución de reacción a una placa de filtro de PVDF de 0,45 µm Millipore MultiScreen IP de 96 pocillos (la placa de filtro se humedece previamente con 200 µl de etanol al 100%, agua destilada y fosfato de potasio 1 M, pH 8,0, respectivamente). La placa de filtro se aspira en un colector Millipore al vacío y se lava con tampón de lavado 18 x 200 µl que contiene fosfato de potasio 1 M, pH 8,0 y ATP 1 mM. Después de secar por aspiración y transferencia, la placa se seca al aire en una incubadora a 37° C durante la

noche. Luego se acopla un adaptador Packard TopCount (Millipore) a la placa seguido de la adición de 120 µl de cóctel de centelleo Microscint 20 (Perkin Elmer) en cada pocillo. Después del sellado de la placa, se determina la radiactividad del producto mediante recuento de centelleo en Topcount (Perkin-Elmer). La determinación de IC₅₀ se realiza ajustando la curva del porcentaje de actividad de control frente al logaritmo de la concentración de inhibidor usando el software GraphPad Prism 3.0.

La sal de ácido clorhídrico de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona se probó en el ensayo del Ejemplo A2 y se determinó que era un inhibidor selectivo de PI3Kδ.

La sal de ácido clorhídrico de (R)-4-(3-((S)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona se probó en el ensayo del Ejemplo A2 y se determinó que era un inhibidor selectivo >100 veces mayor para PI3Kδ sobre cada uno de PI3Kα, PI3Kβ y PI3Kγ.

Ejemplo A3: Ensayo de proximidad de centelleo de PI3Kδ

Materiales

Se adquirió [γ-³³P]ATP (10 mCi/ml) de Perkin-Elmer (Waltham, MA). El sustrato de lípido quinasa, D-mio-fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂)D (+)-sn-1,2-di-O-octanoilglicerilo, 3-O-fosfo enlazado (PIP₂), CAS 204858-53-7, se adquirió de Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT). PI3Kδ (p110δ/p85α) se adquirió de Millipore (Bedford, MA). Se adquirieron ATP, MgCl₂, DTT, EDTA, MOPS y CHAPS de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Las perlas de centelleo YSi SPA de aglutinina de germen de trigo (WGA) se adquirieron de GE healthcare life sciences (Piscataway, NJ).

La reacción de la quinasa se llevó a cabo en una placa blanca de matriz de 384 pocillos de poliestireno de Thermo Fisher Scientific en un volumen final de 25 µl. Los inhibidores se diluyeron primero en serie en DMSO y se añadieron a los pocillos de la placa antes de la adición de otros componentes de reacción. La concentración final de DMSO en el ensayo fue del 0,5%. Los ensayos de **PI3K** se llevaron a cabo a temperatura ambiente en MOPS 20 mM, pH 6,7, MgCl₂ 10 mM, DTT 5 mM y CHAPS al 0,03%. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de ATP, la mezcla de la reacción final consistió en PIP₂ 20 µM, ATP 20 µM, 0,2 µCi [γ-³³P]ATP, PI3Kδ 4 nM. Las reacciones se incubaron durante 210 min y se terminaron mediante la adición de 40 µl de perlas de SPA suspendidas en tampón de inactivación: fosfato de potasio 150 mM pH 8,0, glicerol al 20%. EDTA 25 mM, ATP 400 µM. La concentración final de perlas de SPA fue de 1,0 mg/ml. Después del sellado de la placa, las placas se agitaron durante la noche a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos, la radiactividad del producto se determinó mediante recuento de centelleo en Topcount (Perkin-Elmer). La determinación de IC₅₀ se realizó ajustando la curva del porcentaje de actividad de control frente al logaritmo de la concentración de inhibidor usando el software GraphPad Prism 3.0. Se descubrió que el compuesto de Fórmula I tenía una IC₅₀ de <10 nM en el ensayo del Ejemplo A3.

Ejemplo B1: ensayo de proliferación de células B

Para adquirir células B, se aíslan PBMC humanas de la sangre periférica de donantes normales libres de fármaco mediante centrifugación en gradiente de densidad estándar en Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se incubaron con micropérlas anti-CD 19 (Miltenyi Biotech, Auburn, CA). Luego, las células B se purifican mediante inmunoclasificación positiva usando un autoMacs (Miltenyi Biotech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células B purificadas (2x10⁵/pocillo/200 µl) se cultivan en placas de unión ultrabaja de 96 pocillos (Corning, Corning, NY) en RPMI1640, FBS al 10% e IgM anti-humana F(ab')₂ de cabra (10 µg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA) en presencia de diferentes cantidades de compuestos de prueba durante tres días. Luego se añade [³H]-timidina (1 µCi/pocillo) (PerkinElmer, Boston, MA) en PBS a los cultivos de células B durante 12 horas adicionales antes de que la radiactividad incorporada se separe mediante filtración con agua a través de filtros GF/B (Packard Bioscience, Meriden, CT) y se mida mediante recuento de centelleo líquido con un TopCount (Packard Bioscience).

Ejemplo B2: ensayo de proliferación celular de Pfeiffer

La línea celular Pfeiffer (linfoma de células B grandes difuso) se adquirió de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvo en el medio de cultivo recomendado (RPMI y FBS al 10%). Para medir la actividad antiproliferación de los compuestos, las células Pfeiffer se colocaron en placas con el medio de cultivo (2x10³ células/pocillo/por 200 µl) en placas de unión ultrabaja de 96 pocillos (Corning, Corning, NY), en el presencia o ausencia de un intervalo de concentración de compuestos de prueba. Después de 3-4 días, se añade [³H]-timidina (1 µCi/pocillo) (PerkinElmer, Boston, MA) en PBS al cultivo celular durante 12 horas adicionales antes de que la radiactividad incorporada se separe por filtración con agua a través de filtros GF/B (Packard Bioscience, Meriden, CT) y se mida mediante

recuento de centelleo líquido con un TopCount (Packard Bioscience).

Ejemplo B3: ensayo de proliferación celular SUDHL-6

5 La línea celular SUDHL-6 (linfoma de células B grandes difuso) se adquirió de ATCC (Manassas, VA) y mantuvo en el medio de cultivo recomendado (RPMI y FBS al 10%). Para medir la actividad antiproliferación de los compuestos mediante cuantificación de ATP, las células SUDHL-6 se colocaron en placas con el medio de cultivo (5000 células/pocillo/por 200 µl) en una placa de cultivo de tejido de poliestireno negra transparente de 96 pocillos (Greiner-bio-one a través de VWR, NJ) en presencia o ausencia de un intervalo de concentración de compuestos de prueba. Después de 3 días, se añadió agente de cultivo celular Cell Titer-GLO Luminescent (Promega, Madison, WI) a cada pocillo durante 10 minutos a temperatura ambiente para estabilizar la señal luminiscente. Esto determina el número de células viables en cultivo en base a la cuantificación del ATP presente, que señala la presencia de células metabólicamente activas. La luminiscencia se midió con TopCount 384 (Packard Bioscience de Perkin Elmer, Boston, MA).

Ejemplo C: ensayo de fosforilación de Akt

20 Las células Ramos (linfocitos B de linfoma de Burkitt) se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvieron en RPMI1640 y FBS al 10%. Las células (3×10^7 células/tubo/3 ml en RPMI) se incuban con diferentes cantidades de los compuestos de prueba durante 2 horas a 37° C y luego se estimularon con IgM anti-humana F(ab')₂ de cabra (5 g/ml) (Invitrogen) durante 17 minutos en un baño de agua a 37° C. Las células estimuladas se centrifugan a 4° C con centrifugación y los extractos de células completas se preparan usando tampón de lisis 300 µl (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Los lisados resultantes se sonicen y se recogen los sobrenadantes. El nivel de fosforilación de Akt en los sobrenadantes se analiza usando kits de ELISA en sándwich PathScan phospho-Akt1 (Ser473) (Cell Signaling Technology) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

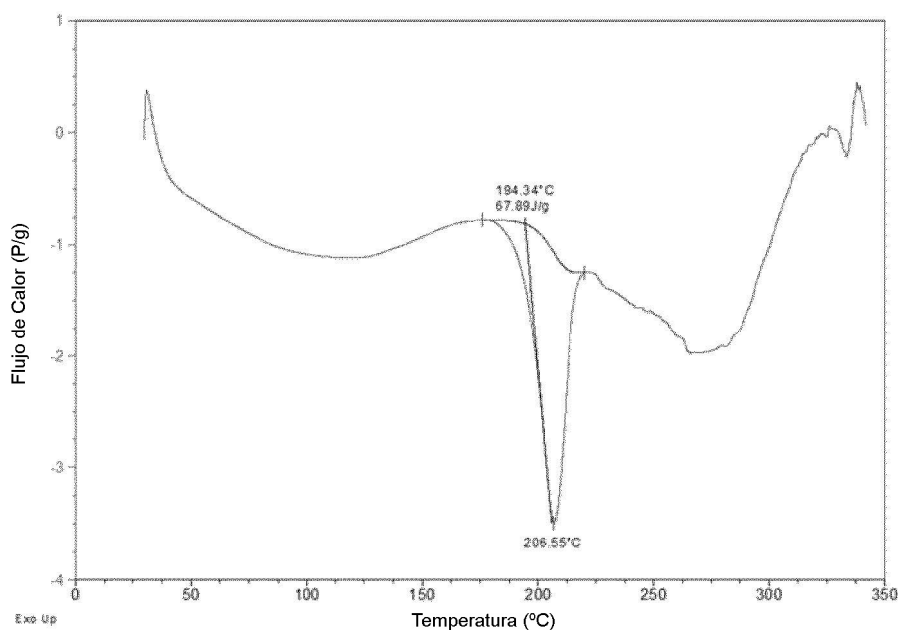
REIVINDICACIONES

1. Una sal que es sal de ácido clorhídrico de (*R*)-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona, que es cristalina.

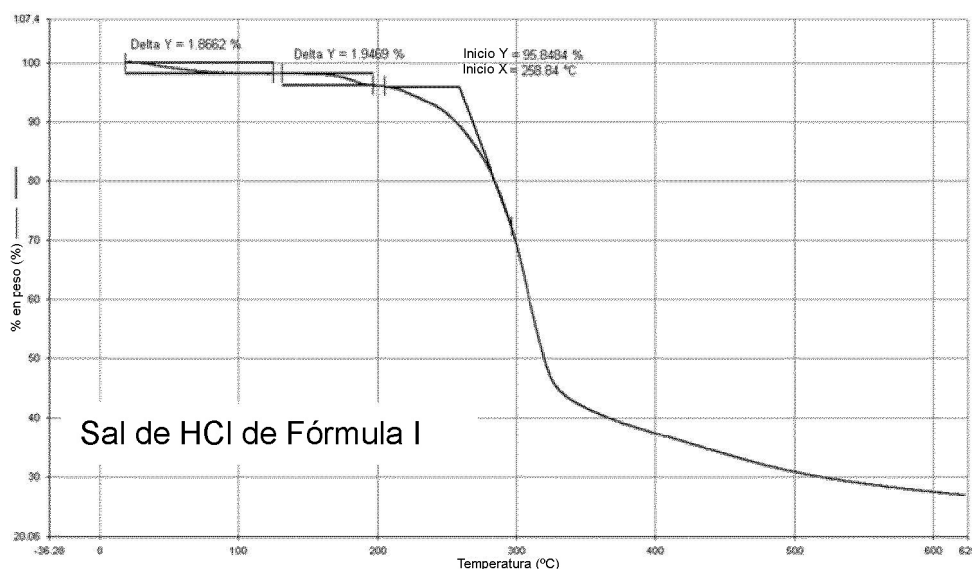
2. La sal de la reivindicación 1 que es una proporción estequiométrica 1:1 de (*R*)-4-(3-((*S*)-1-(4-amino-3-metil-1H-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il)etil)-5-cloro-2-etoxi-6-fluorofenil)pirrolidin-2-ona con ácido clorhídrico.

3. La sal de la reivindicación 1 o 2, **caracterizada por** un termograma de DSC que tiene un pico endotérmico a $207 \pm 3^\circ \text{C}$.

4. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene un termograma de DSC como se muestra a continuación:



5. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene un termograma como se muestra a continuación:



6. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene_

(a) por lo menos un pico de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionado de $11,3^\circ \pm 0,2^\circ$, $16,4^\circ \pm 0,2^\circ$, $21,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $23,0^\circ \pm 0,2^\circ$, $28,1^\circ \pm 0,2^\circ$, $31,2^\circ \pm 0,2^\circ$, y $32,8^\circ \pm 0,2^\circ$;

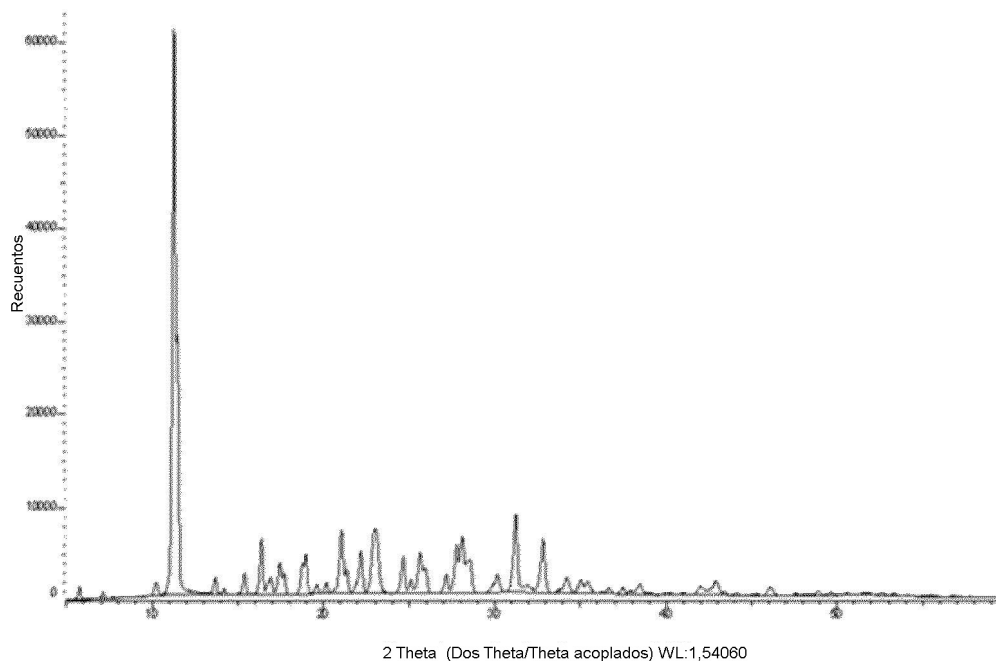
(b) por lo menos dos picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,3^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $16,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $21,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $23,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $28,1^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $31,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, y $32,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$;

(c) por lo menos tres picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,3^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $16,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $21,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $23,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $28,1^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $31,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, y $32,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$;

(d) por lo menos cuatro picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,3^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $16,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $21,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $23,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $28,1^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $31,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, y $32,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$;

(e) por lo menos cinco picos de XRPD, en términos de 2-theta, seleccionados de $11,3^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $16,4^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $21,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $23,0^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $28,1^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, $31,2^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$, y $32,8^{\circ} \pm 0,2^{\circ}$.

7. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene un perfil de XRPD como se muestra a continuación:



8. Una composición farmacéutica que comprende una sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y un portador farmacéuticamente aceptable.

9. Un método para inhibir una actividad de quinasa PI3K δ , in vitro, que comprende poner en contacto la quinasa con una sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10. Una sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se selecciona de púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), anemia hemolítica autoinmune, vasculitis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, pénfigo, anemia hemolítica autoinmune (AIHA), nefropatía membranosa, leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma no de Hodgkin (LNH), leucemia de células pilosas, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma folicular, linfoma linfoplasmocítico, linfoma de zona marginal extraganglionar, linfoma de Hodgkin, macroglobulinemia de Waldenstrom, leucemia prolinfocítica, leucemia linfoblástica aguda, mielofibrosis, linfoma de tejido linfático asociado a mucosas (MALT), linfoma de células B, linfoma mediastínico (tímico) de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfoma de zona marginal esplénica, linfoma de derrame primario, linfoma de células B grandes intravascular, leucemia de células plasmáticas, plasmocitoma extramedular, mieloma latente (también conocido como mieloma asintomático), gammapatía monoclonal de significado indeterminado (MGUS) y linfoma de células B. o la enfermedad es púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) seleccionada de ITP recidivante e ITP refractaria.

o la enfermedad es vasculitis seleccionada de enfermedad de Behçet, síndrome de Cogan, arteritis de células gigantes, polimialgia reumática (PMR), arteritis de Takayasu, enfermedad de Buerger (tromboangitis obliterante), vasculitis del sistema nervioso central, enfermedad de Kawasaki, poliarteritis nodosa, síndrome de Churg-Strauss, vasculitis mixta por crioglobulinemia (esencial o inducida por el virus de la hepatitis C (VHC)), púrpura de Henoch-Schonlein (HSP), vasculitis por hipersensibilidad, poliangeítis microscópica, granulomatosis de Wegener y vasculitis sistémica asociada a anticuerpos del citoplasma anti-neutrófilos (ANCA) (AASV);

o la enfermedad es linfoma no de Hodgkin (NHL) seleccionada de NHL recidivante, NHL refractario y NHL folicular recurrente.

o la enfermedad es linfoma de células B, en donde dicho linfoma de células B es linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).

o la enfermedad es linfoma de células B, en donde dicho linfoma de células B es linfoma de células B grandes difuso

del tipo activado por células B (ABC) o linfoma difuso de células B grandes de células B de centro germinal (GCB).
o la enfermedad es osteoartritis, reestenosis, aterosclerosis, trastornos óseos, artritis, retinopatía diabética, psoriasis, hipertrofia prostática benigna, inflamación, angiogénesis, pancreatitis, enfermedad renal, enfermedad inflamatoria intestinal, miastenia gravis, esclerosis múltiple o síndrome de Sjogren.

o la enfermedad es artritis reumatoide, alergia, asma, glomerulonefritis, lupus o inflamación relacionada con cualquiera de las mencionadas anteriormente.

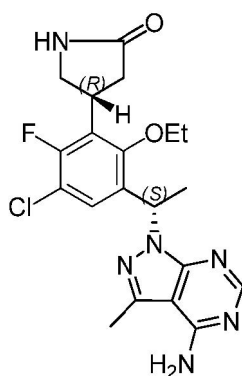
o la enfermedad es lupus que es lupus eritematoso sistémico o nefritis lúpica.

o la enfermedad es cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de endometrio, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de piel, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer renal, cáncer gástrico, o un cáncer hematológico.

o la enfermedad es un cáncer hematológico que es leucemia mieloblástica aguda o leucemia mieloide crónica.

o la enfermedad es lesión pulmonar aguda (ALI) o síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS).

11. Un proceso para preparar la sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende hacer reaccionar un compuesto de Fórmula I:



I

con ácido clorhídrico para formar dicha sal.

12. El proceso de la reivindicación 11, en donde dicho ácido clorhídrico es ácido clorhídrico acuoso 1 M.

13. El proceso de la reivindicación 11 o 12, en donde dicha reacción se realiza a una temperatura de 45° C a 55° C.

14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde el proceso comprende:

añadir ácido clorhídrico al compuesto de Fórmula I a temperatura ambiente para formar una lechada; calentar dicha lechada a una temperatura de 45° C a 55° C para formar una solución; y enfriar la solución a una temperatura de 0° C a 5° C para cristalizar dicha sal.

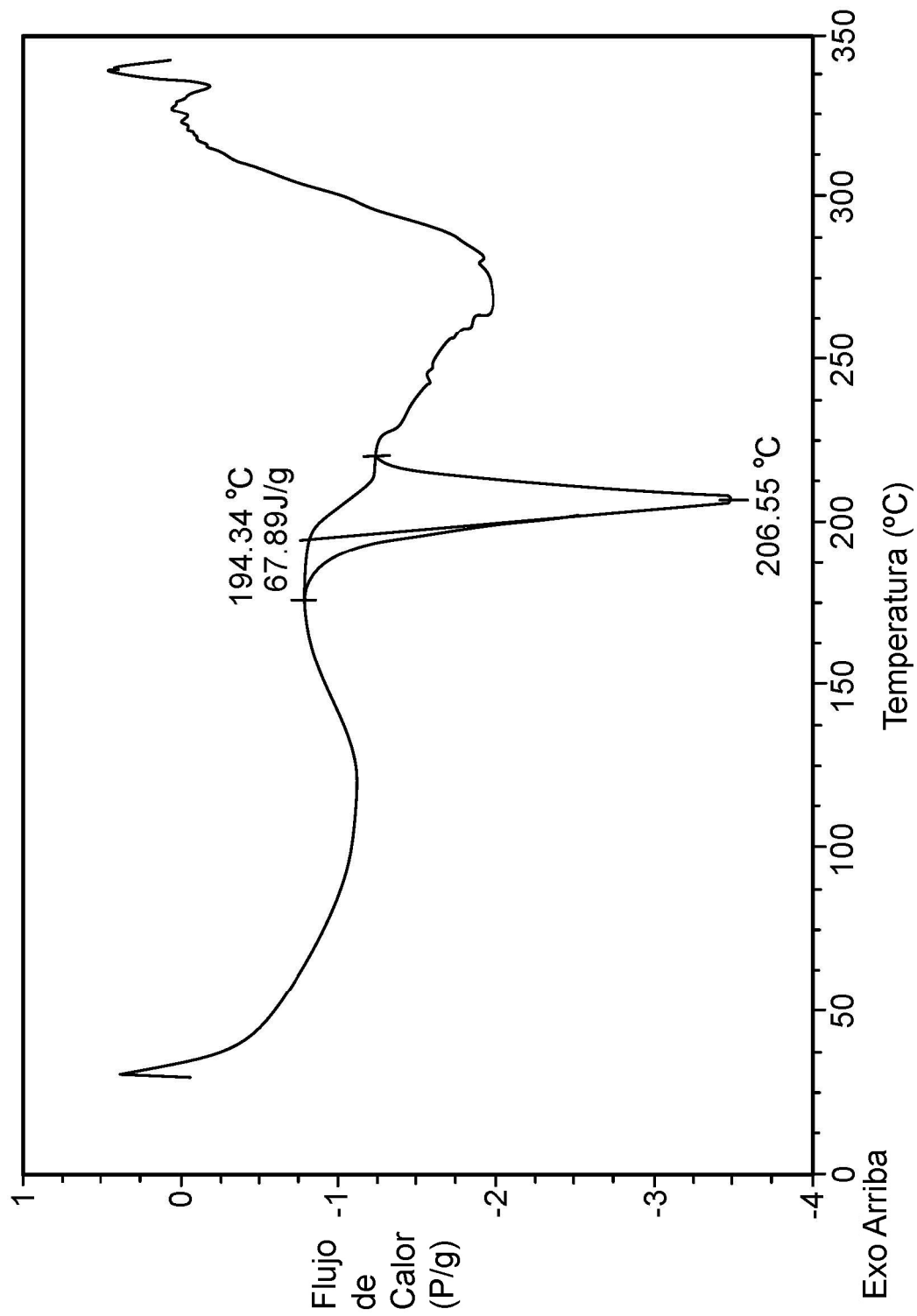


FIG. 1

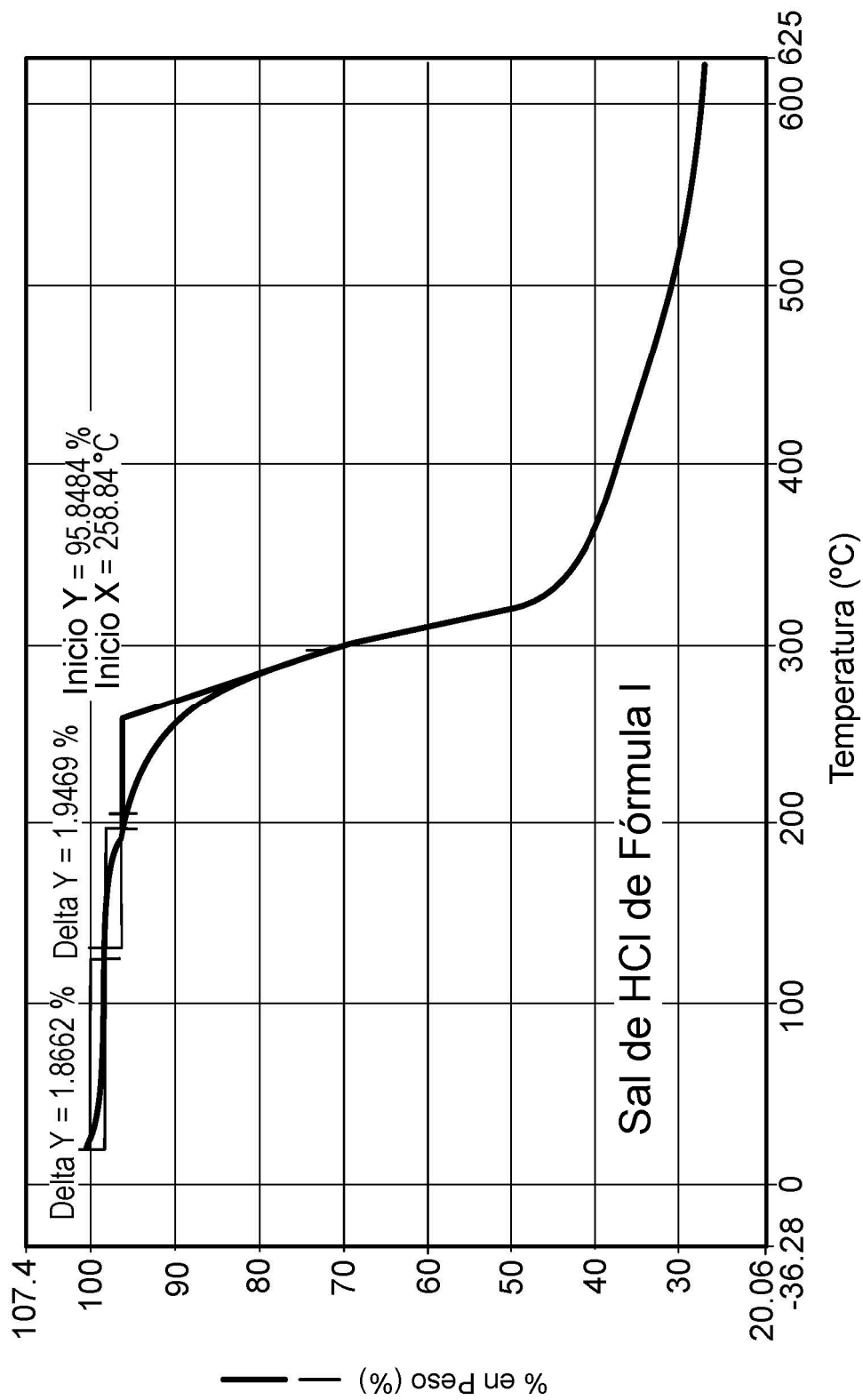


FIG. 2

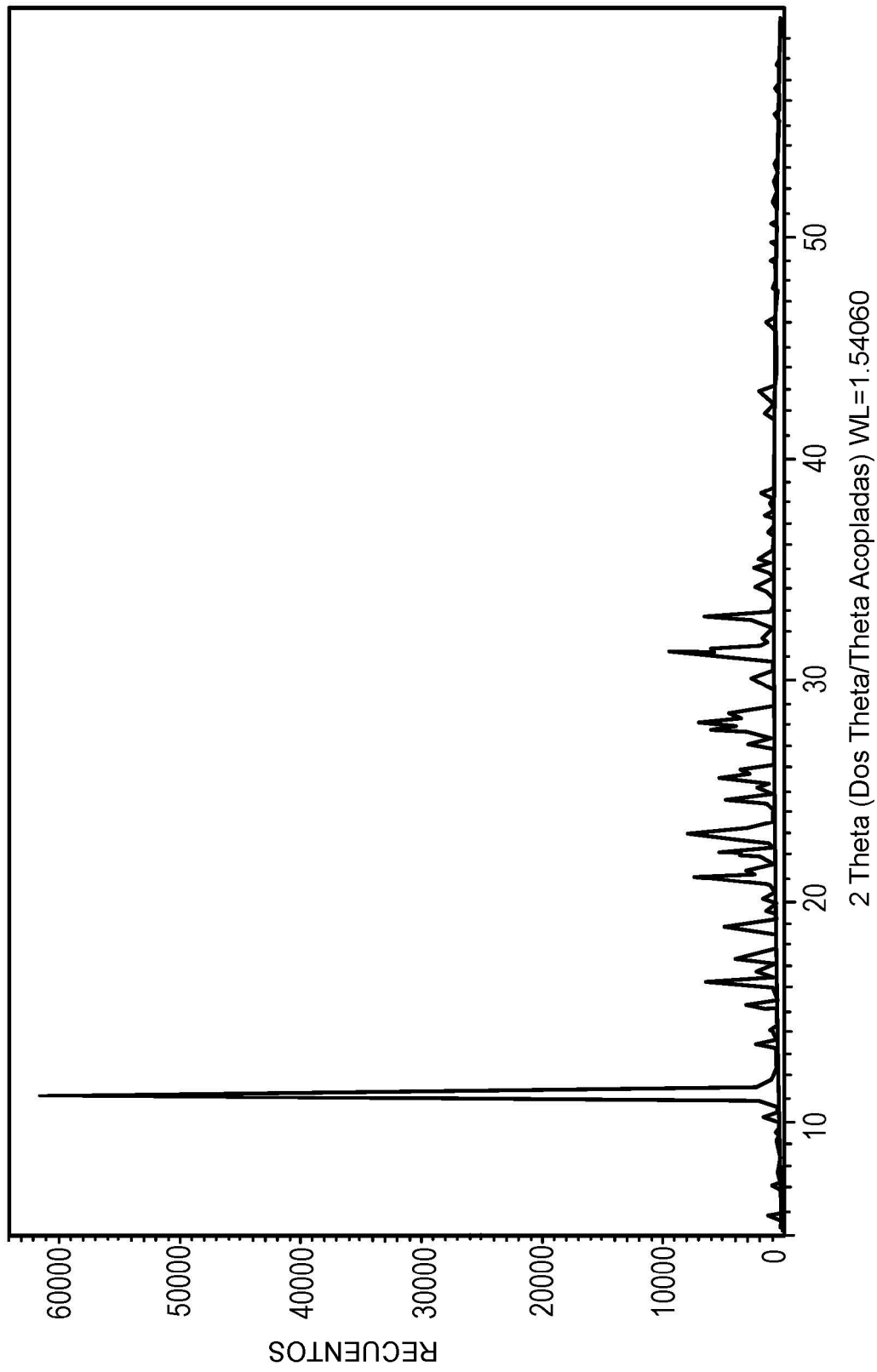


FIG. 3