

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 754**

51 Int. Cl.:

C07D 473/38	(2006.01)	A61K 31/52	(2006.01)
C07D 473/34	(2006.01)	A61P 7/00	(2006.01)
C07D 473/00	(2006.01)	A61P 29/00	(2006.01)
C07D 473/24	(2006.01)	A61P 19/10	(2006.01)
C07D 473/16	(2006.01)		
C07D 473/40	(2006.01)		
C07D 473/30	(2006.01)		
C07D 403/12	(2006.01)		
C07D 487/04	(2006.01)		
A61K 31/517	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2001 E 08006457 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 1939203**

54 Título: **Inhibidores de la isoforma delta de la fosfatidilinositol 3-quinasa humana**

30 Prioridad:

25.04.2000 US 199655 P
05.10.2000 US 238057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2015

73 Titular/es:

ICOS CORPORATION (100.0%)
22021 20TH AVENUE S.E.
BOTHELL, WA 98201, US

72 Inventor/es:

SADHU, CHANCHAL;
DICK, KEN;
SOWELL, C. GREGORY;
KESICKI, EDWARD A.;
OLIVER, AMY y
TREIBERG, JENNIFER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 527 754 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la isoforma delta de la fosfatidilinositol 3-quinasa humana

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a las enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y más particularmente, a los inhibidores selectivos de la actividad de las PI3K.

10 **Antecedentes de la invención**

La señalización de las células mediante fosfoinosítidos fosforilados en posición 3 ha estado implicada en diversos procesos celulares, como la transformación maligna, la señalización del factor de crecimiento, la inflamación e inmunidad (véase en Rameh et al., J. Biol Chem, 274:8347-8350 (1999) una revisión). La enzima responsable de generar estos productos de señalización fosforilados, la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa; PI3K), se identificó originalmente como una actividad asociada con oncoproteínas virales y el factor de crecimiento tirosina quinasa que fosforila el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el hidroxilo de posición 3' del anillo de inositol (Panayotou et al., Trends Cell Biol 2:358-60 (1992)).

20 Los niveles de fosfatidilinositol-3, 4,5-trifosfato (PIP3), el principal producto de la activación de la PI3-quinasa, aumentan tras el tratamiento de las células con diversos agonistas. Por tanto, se cree que la activación de la PI 3-quinasa, está implicada en una serie de respuestas celulares entre las que se incluyen el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Parker et al., Current Biology, 5:577-99 (1995); Yao et al., Science. 267:2003-05 (1995)). A pesar de que las dianas aguas abajo de los lípidos fosforilados que se generan tras la activación de la PI3-quinasa no están bien caracterizadas, las pruebas emergentes sugieren que las proteínas que contienen el dominio de homología con pleckstrina y el dominio de tipo dedo FYVE se activan cuando se unen a diversos lípidos de fosfatidilinositol (Sternmark et al., J Cell Sci, 112:4175-83 (1999); Lemmon et al., Trends Cell Biol, 7:237-42 (1997)). *In vitro*, algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) son activadas directamente por el PIP3; y se ha demostrado que la proteína quinasa relacionada con la PKC, PKB, es activada por la PI 3-quinasa (Burgering et al., Nature, 376:599-602 (1995)).

Actualmente, la familia de las enzimas PI 3-quinasas se ha dividido en tres clases basándose en sus especificidades de sustrato. Las PI3K de clase I pueden fosforilar el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol-4-fosfato y el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), fosfatidilinositol-3, 4-bifosfato y fosfatidilinositol-3, 4,5-trifosfato, respectivamente. Las PI3K de clase II fosforilan el PI y el fosfatidilinositol-4-fosfato, mientras que las PI3K de clase III solamente pueden fosforilar el PI.

La purificación inicial y la clonación molecular de la PI 3-quinasa revelaron que se trataba de un heterodímero compuesto por las subunidades p85 y p110 (Otsu et al., Cell, 65:91-104 (1991); Hiles et al., Cell. 70:419-29 (1992)). Desde entonces, se han identificado cuatro PI3K de clase I, denominadas PI3K α , β , δ , y γ , compuestas cada una por una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad reguladora diferente. Más concretamente, tres de las subunidades catalíticas, es decir p110 α , p110 β y p110 δ , interaccionan cada una con la misma subunidad reguladora, p85; mientras que p110 γ interacciona con una subunidad reguladora distinta, p101. Como se describe a continuación, los patrones de expresión de cada una de estas PI3K en los tejidos y células humanas también son distintos. A pesar de que recientemente se ha acumulado mucha información sobre las funciones celulares de las PI3-quinasas en general, las funciones que desempeñan las isoformas individuales son en gran medida desconocidas.

Se ha descrito la clonación de la p110 α bovina. Se identificó que esta proteína estaba relacionada con la proteína de *Saccharomyces cerevisiae*: Vps34p, una proteína implicada en el procesamiento de la proteína vacuolar. También se demostró que el producto de la p110 α recombinante se asocia con p85 α , para generar una actividad de PI3K en las células COS-1 transfectadas. Véase Hiles et al., Cell. 70.419-29(1992).

La clonación de una segunda isoforma humana de p110, denominada p110 β , se describe en Hu et al., Mol Cell Biol, 13:7677-88 (1993). Se dice que esta isoforma se asocia con p85 en las células, y que se expresa de forma omnipresente, dado que se ha encontrado ARNm de p110 β en numerosos tejidos humanos y murinos, así como en células endoteliales de la vena umbilical humana, células T de leucemia humana de Jurkat, células renales 293 embrionarias humanas, fibroblastos 3T3 de ratón, células HeLa y células de carcinoma de vejiga NBT2 en ratas. Esta expresión tan amplia sugiere que esta isoforma es muy importante para las vías de señalización.

La identificación de la isoforma p110 δ de la PI 3-quinasa se describe en Chantry et al., J Biol. Chem, 272:19236-41 (1997). Se observó que la isoforma p110 δ humana se expresa de forma limitada en los tejidos. Se expresa a niveles elevados en los linfocitos y tejidos linfoides, lo que sugiere que la proteína podría participar en la señalización mediada por la PI3-quinasa en el sistema inmunológico. Los detalles relativos a la isoforma P110 δ se pueden encontrar también en las patentes estadounidenses nº 5.858.753; 5.822.910; y 5.985.589. Véase también Vanhaesebroeck et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94:4330-5 (1997), y la publicación internacional WO 97/46688.

En cada uno de los subtipos PI3K α , β , y δ , la subunidad p85 actúa localizando la PI 3-quinasa en la membrana plasmática mediante la interacción de su dominio SH2 con los restos de tirosina fosforilada (presentes en el contexto de una secuencia apropiada) en las proteínas diana (Rameh et al., Cell. 83:821-30 (1995)). Se han identificado dos isoformas de p85: p85 α , que se expresa de forma ubicua, y p85 β , que se encuentra principalmente en el cerebro y los tejidos linfoides (Volinia et al., Oncogene. 7:789-93 (1992)). La asociación de la subunidad p85 con las subunidades catalíticas p110 α , β o δ de la PI3-quinasa parece ser necesaria para la actividad catalítica y estabilidad de estas enzimas. Por otra parte, la unión de proteínas Ras también regula por aumento la actividad de la PI 3-quinasa.

La clonación de p110 γ reveló una complejidad aún mayor dentro de la familia de enzimas PI3K (Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)). La isoforma p110 γ está estrechamente relacionada con p110 α y p110 β (45-48 % de identidad en el dominio catalítico), pero como se ha señalado no utiliza p85 como subunidad diana. En su lugar, p110 γ contiene un dominio adicional denominado "dominio de homología con pleckstrina" cerca de su extremo amino. Este dominio permite la interacción de p110 γ con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas y esta interacción parece regular su actividad.

La subunidad reguladora p101 para PI3K gamma se clonó originalmente en porcino y el ortólogo humano se identificó posteriormente (Krugmann et al., J Biol Chem, 274:17152-8 (1999)). La interacción entre la región N-terminal de p101 y la región N-terminal de p110 γ parece ser crucial para la activación de PI3K γ mediante G $\beta\gamma$ anteriormente mencionada.

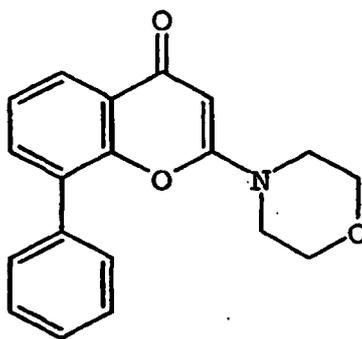
En la publicación internacional WO 96/25488, se describe un polipéptido constitutivamente activo de PI3K. Esta publicación divulga la preparación de una proteína de fusión quimérica en la que un fragmento del residuo 102 de la p85, conocido como región inter-SH2 (iSH2), se fusiona a través de una región de enlace al N-terminal de la p110 murina. Aparentemente el dominio iSH2 de p85 es capaz de activar la actividad de PI3K de manera comparable al p85 intacto (Klippel et al., Mol Cell Biol, 14:2675-85 (1994)).

De este modo, las PI 3-quinasas se pueden definir por la identidad de su aminoácido o por su actividad. Miembros adicionales de esta creciente familia de genes incluyen lípidos y proteínas quinasas relacionados de forma más distante, entre los que se incluyen Vps34 TOR1 y TOR2 de *Saccharomyces cerevisiae* (y sus homólogos en mamíferos como FRAP y mTOR), el producto genético de la ataxia telangiectasia (ATR) y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK). Véase, en general, Hunter. Cell. 83:1-4 (1995).

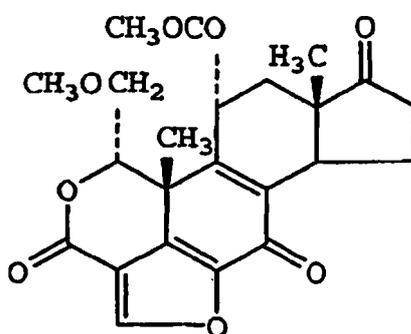
Asimismo, parece que la PI3-quinasa está implicada en una serie de aspectos de la activación leucocitaria. Se ha mostrado que una actividad PI3-quinasa asociada con p85 se asocia físicamente con el dominio citoplásmico del CD28, que es una importante molécula co-estimuladora para la activación de linfocitos T en respuesta a un antígeno (Pages et al., Nature. 369: 327-29 (1994); Rudd, Immunity. 4:527-34 (1996)). La activación de los linfocitos T a través del CD28 disminuye el umbral de la activación por el antígeno e incrementa la magnitud y la duración de la respuesta proliferativa. Estos efectos están relacionados con incrementos en la transcripción de una serie de genes, incluida la interleuquina-2 (IL2), un importante factor de crecimiento de linfocitos T (Fraser et al., Science. 251:313-16 (1991)). La mutación de CD28 de forma que ya no pueda interactuar con la PI 3-quinasa impide que se inicie la producción de IL2, lo que sugiere un papel fundamental de la PI 3-quinasa en la activación de células T.

Inhibidores específicos contra miembros individuales de una familia de enzimas proporcionan herramientas valiosas para descifrar las funciones de cada enzima. Dos compuestos, LY294002 y wortmanina han usado ampliamente como inhibidores de la PI 3-quinasa. No obstante, estos compuestos son inhibidores inespecíficos de la PI3K, ya que no distinguen entre los cuatro miembros de las PI 3-quinasas de clase I. Por ejemplo, los valores de CI₅₀ de la wortmanina contra cada una de las diversas PI 3-quinasas de clase I están en el intervalo de 1-10 nM. De igual modo, los valores de CI₅₀ de LY294002 frente a cada una de estas PI 3-quinasas son de aproximadamente 1 μ M (Fruman et al., Ann Rev Bio-chem, 67:481-507 (1998)). Por eso, la utilidad de estos compuestos para estudiar las funciones de cada una de las PI 3-quinasas de Clase I es limitada.

Sobre la base de los estudios con wortmanina, existen pruebas de que la función de PI3-quinasa también es necesaria para algunos aspectos de la señalización de leucocitos a través de receptores acoplados a proteína G (Thelen et al., Proc Natl Acad Sci USA, 91:4960-64 (1994)). Por otra parte, se ha demostrado que la wortmanina y LY294002 bloquean la migración de los neutrófilos y la liberación de superóxido. No obstante, puesto que estos compuestos no distinguen entre las diversas isoformas de PI3K, no está claro qué isoforma o isoformas de PI3K en concreto están implicadas en estos fenómenos.



LY294002



Wortmanina

5 En vista de las consideraciones anteriores, está claro que no se dispone de suficiente información acerca de las características estructurales y funcionales de las enzimas PI 3-quinasa, incluyendo la localización subcelular, los estados de activación, las afinidades por el sustrato y similares. Además, las funciones que estas enzimas realizan tanto en tejidos sanos como en tejidos enfermos están por aclarar. En particular, la función de PI3K δ en los leucocitos no se ha caracterizado anteriormente y los conocimientos relativos a su función en la fisiología humana siguen siendo limitados. La coexpresión en estos tejidos de otras isoformas de PI3K ha confundido hasta ahora los esfuerzos por segregarse las actividades de cada enzima. Adicionalmente, la separación de las actividades de las diversas isoenzimas PI3K puede no resultar posible sin la identificación de inhibidores que demuestren unas características de inhibición selectiva. De hecho, los solicitantes no tienen constancia en estos momentos de que se haya demostrado la existencia de estos inhibidores selectivos de las isoenzimas PI3K.

15 Por tanto, existe la necesidad en la técnica de profundizar en la caracterización estructural del polipéptido PI3K δ . También existe la necesidad de profundizar en la caracterización funcional de PI3K δ . Adicionalmente, los inventores requieren ampliar sus conocimientos sobre la PI3K δ en lo que respecta a las interacciones estructurales de p110 δ , tanto con su subunidad reguladora como con otras proteínas de la célula. También sigue pendiente el descubrimiento de inhibidores selectivos o específicos de las isoenzimas PI3K, al objeto de poder caracterizar mejor las funciones de cada una de ellas. En particular, el descubrimiento de los inhibidores selectivos o específicos de PI3K δ resulta recomendable para estudiar el papel de esta isoenzima y para el desarrollo de productos farmacéuticos que modulen su actividad.

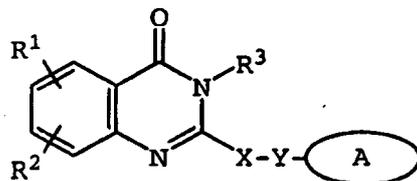
25 Un aspecto de la presente invención consiste en proporcionar compuestos que puedan inhibir la actividad biológica de la PI3K δ humana. Otro aspecto de la invención consiste en proporcionar compuestos que inhiban la PI3K δ de forma selectiva, manteniendo una potencia inhibidora relativamente baja con respecto a las demás isoformas de PI3K. Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán fácilmente de manifiesto para el profesional con los conocimientos normales en la técnica.

30 Resumen de la técnica anterior

El documento WO 94/17090 A divulga derivados de 2,6-diaminopurina para su uso en medicina como agentes antiinflamatorios, en particular en el tratamiento de pacientes con afecciones inflamatorias que son susceptibles a daños tisulares inducidos por leucocitos.

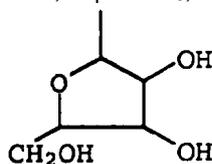
El documento EP-A-0 675 124 divulga derivados de purina o sales farmacéuticamente aceptables como supresores de enfermedades inflamatorias.

De acuerdo con la presente invención se proporciona un compuesto que tiene una fórmula de estructura general



en el que el sistema de anillo A se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, 1, 2, 3-triazolilo, pirdizininilo, pirimidinilo, pirazinilo, 1, 3, 5-triazinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 1, 8-naftiridinilo, pteridinilo, 1H-indazolilo, y benzimidazolilo

cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido opcionalmente con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en $N(R^a)_2$, halo, alquilo C_{1-3} , $S(\text{alquilo } C_{1-3})$, OR^a , halo y



en el que X se selecciona del grupo que consiste en CHR^b , CH_2CHR^b , y $CH=C(R^b)$;

Y se selecciona del grupo que consiste en nada, SO, SO_2 , NH, O, $C(=O)$, $OC(=O)$, $C(=O)O$ y $NHC(=O)CH_2S$;

R^1 y R^2 , independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, halo, $NHC(=O)$ alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, NO_2 , OR^a , OCF_3 , $N(R^a)_2$, CN, $OC(=O)R^a$, $C(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, aril OR^b , Het, $NR^aC(=O)$ alquilenilo $C_{1-3}C(=O)OR^a$, arilOalquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, aril $OC(=O)R^a$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$, Oalquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$, alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^a$, $C(=O)NR^aSO_2R^a$, alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{2-6}N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}Het$, Oalquilenilo $C_{2-4}N(R^a)_2$, Oalquilenilo $C_{1-4}CH(OR^b)CH_2N(R^a)_2$, Oalquilenilo $C_{1-4}Het$, Oalquilenilo $C_{2-4}OR^a$, Oalquilenilo $C_{2-4}NR^aC(=O)OR^a$, $NR^aC_{1-4}alquileniloN(R^a)_2$, $NR^aC(=O)R^a$, $NR^aC(=O)N(R^a)_2$, $N(SO_2C_{1-4}alquilo)_2$, $NR^a(SO_2C_{1-4}alquilo)$, $SO_2N(R^a)_2$, OSO_2CF_3 , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, alquilenilo $C_{1-4}Het$, alquilenilo $C_{1-6}OR^b$, alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, $C(=O)N(R^a)_2$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}arilo$, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , arilOalquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, aril $OC(=O)R^b$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}heterocicloalquilo C_{3-8}$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}Het$, Oalquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^b$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}Het$, y $NHC(=O)haloalquilo C_{1-6}$;

R^1 y R^2 se unen para formar un componente con una cadena de alquilenilo o alquilenilo de 3 ó 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

R^3 es hidrógeno o se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} sustituido o no sustituido, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilenilo C_{1-4} cicloalquilo, alquilenilo C_{2-6} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, arilalquilo C_{1-3} , $C(=O)R^a$, arilo, heteroarilo, $C(=O)OR^a$, $C(=O)N(R^a)_2$, $C(=S)N(R^a)_2$, SO_2R^a , $SO_2N(R^a)_2$, $S(=O)R^a$, $S(=O)N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}Het$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}arilo$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}heteroarilo$, alquilenilo $C_{1-4}arilo$ opcionalmente sustituido con uno o más de halo, $SO_2N(R^a)_2$, $N(R^a)_2$, $C(=O)OR^a$, $NR^aSO_2CF_3$, CN, NO_2 , $C(=O)R^a$, OR^a , alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, y alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{1-4}heteroarilo$, alquilenilo $C_{1-4}Het$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)alquilenilo C_{1-4}arilo$, $C_{1-4}alquileniloC(=O)C_{1-4}alquilenoheteroarilo$, $C_{1-4}alquilenilo-C(=O)Het$, $C_{1-4}alquileniloC(=O)N(R^a)_2$, $C_{1-4}alquileniloOR^a$, alquilenilo $C_{1-4}NR^aC(=O)R^a$, alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}OR^a$, alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$, y alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^a$;

R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, arilo, arilalquilo C_{1-3} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, heteroarilo, heteroarilalquilo C_{1-3} y alquilenilo $C_{1-3}heteroarilo$; o dos grupos R^a se unen para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que opcionalmente contienen al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, arilalquilo C_{1-3} , heteroarilalquilo C_{1-3} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, y alquilenilo $C_{1-3}heteroarilo$;

Het es un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros, saturado o parcial o totalmente insaturado que contiene al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido con alquilo C_{1-4} o $C(=O)OR^a$;

y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

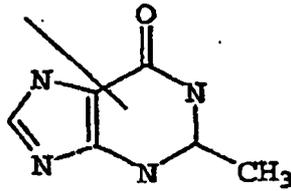
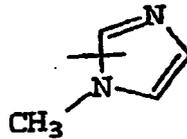
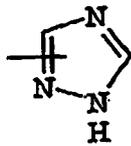
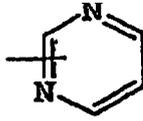
en el que "arilo", se define aquí como un grupo aromático monocíclico o policíclico que puede estar no sustituido o sustituido con uno o más halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinito y alquilsulfonilo, y en el que "heteroarilo" se define como un sistema de anillo monocíclico o bicíclico que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo aromático, que puede estar no sustituido o sustituido con uno o más halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinito y alquilsulfonilo.

Preferentemente, X se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃) y C(CH₃)₂.

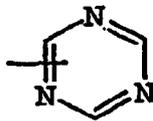
De forma ventajosa, Y se selecciona del grupo que consiste en nada y NH.

5 De forma conveniente, el sistema del anillo A está no sustituido.

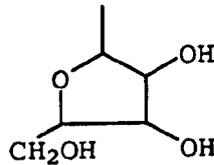
Preferentemente, sistema de anillo se selecciona del grupo que consiste en:



10 y

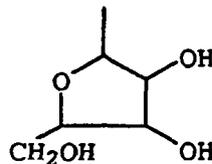


Convenientemente, el sustituyente del anillo A está sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en N(R^a)₂, halo, alquilo C₁₋₃, S (alquilo C₁₋₃), OR^a, halo y



15

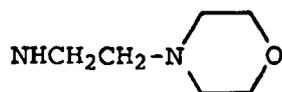
De forma ventajosa, el sistema del anillo A está sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en NH₂, NH(CH₃), N(CH₃)₂, NHCH₂C₆H₅, NH(C₂H₅), Cl, F, CH₃, SCH₃, OH, y



20

Preferentemente, R¹ y R² se seleccionan, de forma independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, OR^a, halo, alquilo C₁₋₆, CF₃, NO₂, N(R^a)₂, N(R^a)alquileo C₁₋₃N(R^a)₂, y Oalquileo C₁₋₃OR^a.

25 Convenientemente, R¹ y R² se seleccionan, de forma independiente, de H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

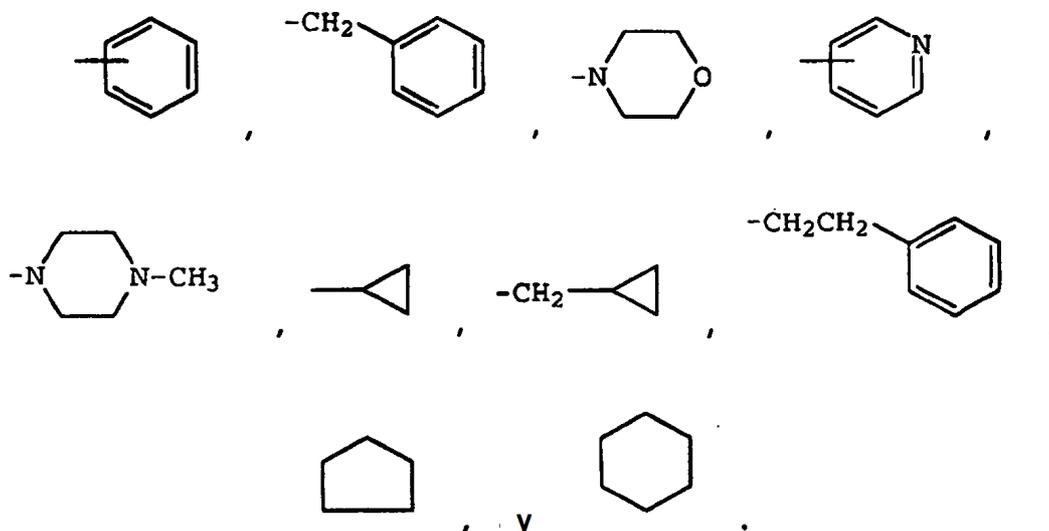


y O (CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

De forma ventajosa, R¹ y R² se unen para formar un anillo de cinco o seis miembros.

De forma ventajosa, R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, C(=O)OR³, alquilenos C₁₋₄ Het, alquilen C₁₋₄-cicloalquilo, alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O) alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O) OR^a, alquilen C₁₋₄-C(=O) N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄ C(=O) Het, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, y alquilen C₁₋₄NR^aC(=O) R^a.

Convenientemente, R³ se selecciona del grupo que consiste en OR^a, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, NO₂, N(R^a)₂, NR^aC(=O)R^a, C(=O)OC₂H₅, CH₂CH(CH₃)₂,



De forma ventajosa, R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, OR^a, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, NO₂, N(R^a)₂, NR^aSO₂CF₃, NR^aC(=O)R^a, C(=O)OR^a, SO₂N(R^a)₂, CN, C(=O)R^a, alquilenos C₁₋₄ (R^a)₂, O-alquilenos C₁₋₄ N(R^a)₂ y N(R^a)alquilenos C₁₋₄N(R^a)₂.

Preferentemente, R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en Cl, F, CH₃, CH(CH₃)₂, OCH₃, C₆H₅, NO₂, NH₂, NHC(=O)CH₃, CO₂H, y N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)₂.

La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un compuesto o una composición de acuerdo con la invención para su uso en terapia.

Convenientemente, el compuesto o composición es para usar en un método para mejorar un trastorno de reabsorción ósea en un animal.

Dicho trastorno de reabsorción ósea puede ser osteoporosis.

De forma ventajosa, el compuesto o composición es para usar en un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de células de leucemia mielógena crónica.

Preferentemente, el compuesto o composición es para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de

i) isquemia, preferentemente a causa de una parada cardiaca, infarto de miocardio, obstrucción de una arteria coronaria, oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, lesión por traumatismo craneoencefálico, edema y tumor cerebral,

ii) lesión por reperfusión, preferentemente asociada con ictus vascular, shock hemorrágico, infarto o isquemia de

miocardio, trasplante de órganos y vasoespasmo cerebral,

5 iii) enfermedades óseas, preferentemente seleccionadas de osteoporosis, enfermedad de Paget y otros trastornos de reabsorción ósea relacionados,

iv) cánceres hematopoyéticos, preferentemente;

10 a) linfomas seleccionados preferentemente de linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfomas linfocíticos;

b) mielomas múltiples

15 c) leucemias seleccionadas preferentemente de leucemias linfocíticas, leucemias (mielógenas) mieloides crónicas,

v) enfermedades relacionadas con la liberación de histamina, seleccionadas preferentemente de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, SDRA y enfisema,

20 vi) enfermedades artríticas, preferentemente seleccionadas de artritis reumatoide, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis,

vii) enfermedad de Behcet,

25 viii) septicemia, shock séptico, shock endotóxico, septicemia por gramnegativos, septicemia por grampositivos y síndrome del shock tóxico,

ix) síndrome de disfunción orgánica múltiple secundario a septicemia, traumatismo o hemorragia,

30 x) trastornos oftálmicos, seleccionados preferentemente de conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y oftalmopatía asociada con la tiroides,

xi) granuloma eosinofílico,

35 xii) trastornos respiratorios o pulmonares, seleccionados preferentemente de asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica SDRA, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasia y toxicidad del oxígeno del pulmón,

40 xiii) fibrosis, preferentemente fibrosis cística,

xiv) formación de queloides o formación de tejido de cicatriz,

xv) aterosclerosis

45 xvi) enfermedades autoinmunes, seleccionadas preferentemente de lupus sistémico eritematoso (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Reynaud,

xvii) trastornos de rechazo de trasplantes, seleccionados preferentemente de EICH y rechazo de aloinjertos,

50 xviii) glomerulonefritis crónica,

xix) enfermedades inflamatorias del intestino, seleccionadas preferentemente enfermedad intestinal inflamatoria crónica (EIIC), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante,

55 xx) dermatosis inflamatorias seleccionadas preferentemente de dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis y urticaria,

xxi) fiebre y mialgias debido a una infección,

60 xxii) trastornos inflamatorios del sistema nervioso central o periférico, seleccionados preferentemente de meningitis, encefalitis, y lesiones cerebrales o de la médula espinal debido a traumatismos leves,

xxiii) síndrome de Sjogren,

65 xxiv) enfermedades que implican una diapedesis leucocitaria,

- xxv) hepatitis alcohólica,
- xxvi) neumonía bacteriana,
- 5 xxvii) enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo,
- xxviii) shock hipovolémico,
- xxix) diabetes mellitus de tipo I,
- 10 xxx) hipersensibilidad aguda y retardada,
- xxxii) estados de enfermedad provocados por discrasia leucocitaria y metástasis,
- 15 xxxii) lesión térmica,
- xxxiii) síndromes asociados con la transfusión de granulocitos y
- xxxiv) y toxicidad inducida por citocinas.

De forma ventajosa, el compuesto o composición es para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en leucemia, linfoma y mieloma múltiple.

Preferentemente el compuesto o composición es para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfomas linfocíticos, mieloma múltiples, leucemia linfocítica y leucemias (mielógena) mielóide crónica.

Convenientemente, el compuesto o composición es para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en EPOC, asma, artritis reumatoide, diabetes, rinitis alérgica y esclerosis múltiple.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de un compuesto comparativo inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la actividad de tres isoformas de PI3K.

La Figura 2 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la generación de superóxido por los neutrófilos humanos en presencia de TNF o IgG.

La Figura 3 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la generación de superóxido por los neutrófilos humanos en presencia de TNF o fMLP.

La Figura 4 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la exocitosis de elastasa en presencia de fMLP por neutrófilos humanos.

La Figura 5 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la quimiotaxis inducida por fMLP por neutrófilos humanos.

La Figura 6 muestra que un inhibidor selectivo de PI3K δ no afecta a la fagocitosis y muerte de *S. aureus* por los neutrófilos.

La Figura 7 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la proliferación y producción de anticuerpos por los linfocitos B humanos.

La Figura 8 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la proliferación de linfocitos B esplénicos de ratón estimulados anti-IgM.

La Figura 9 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3K δ sobre la exocitosis de la elastasa en un modelo animal.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La invención proporciona compuestos que inhiben selectivamente la actividad de PI3K δ . La enzima PI3K δ puede incluir una enzima purificada y aislada, en la que la enzima se aísla de una fuente natural (por ejemplo, células o tejidos que expresan con normalidad una modificación ausente del polipéptido PI3K δ mediante tecnología recombinante) o se aísla de células modificadas mediante técnicas recombinantes para expresar la enzima exógena.

El término "inhibidor selectivo de PI3K δ " utilizado aquí se refiere a un compuesto que inhibe la isoenzima PI3K δ de forma más efectiva que las demás isoenzimas de la familia PI3K. Se entiende que un compuesto "inhibidor selectivo de PI3K δ " es más selectivo para la PI3K δ que los compuestos denominados de forma convencional y genérica inhibidores de PI3K, como la wortmanina o LY294002. Concomitantemente, la wortmanina y LY294002 se consideran "inhibidores no selectivos de PI3K". Los compuestos de cualquier tipo que regulan negativamente la actividad o la expresión de PI3K δ de forma selectiva se pueden emplear como inhibidores selectivos de PI3K δ en los métodos de la invención. Por otra parte, los compuestos de cualquier tipo que regulan negativamente la actividad o la expresión de PI3K δ de forma

selectiva y que poseen unas propiedades farmacológicas aceptables se pueden emplear como inhibidores selectivos de PI3K δ en los métodos terapéuticos de la divulgación.

Las eficacias relativas de los compuestos como inhibidores de la actividad de una enzima (u otra actividad biológica) se pueden establecer determinando las concentraciones a las que cada compuesto inhibe la actividad en un grado predefinido para, a continuación, comparar los resultados. Normalmente, la determinación preferible es la concentración que inhibe el 50 % de la actividad en un ensayo bioquímico, es decir la concentración inhibidora del 50 % o "CI₅₀". La determinación de las CI₅₀ se puede conseguir utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En general, una CI₅₀ se puede determinar midiendo la actividad de una determinada enzima en presencia de una serie de concentraciones del inhibidor estudiado. A continuación, los valores obtenidos experimentalmente de la actividad de la enzima se representan frente a las concentraciones del inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que demuestra una actividad de la enzima del 50 % (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor CI₅₀. Del mismo modo, se pueden definir otras concentraciones inhibidoras a través de determinaciones apropiadas de la actividad. Por ejemplo, en algunos contextos puede resultar deseable establecer una concentración inhibidora del 90 %, es decir CI₉₀, etc.

Por consiguiente, alternativamente se puede entender que un "inhibidor selectivo de PI3K δ " se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibidora del 50 % (CI₅₀) con respecto a PI3K δ , que es al menos 10 veces, preferentemente al menos 20 veces y más preferentemente al menos 30 veces inferior al valor CI₅₀ con respecto a alguno o a todos los demás miembros de la familia de PI3K de clase I. El término "inhibidor específico de PI3K δ " se puede entender que se refiere a un compuesto inhibidor selectivo de PI3K δ que presenta un valor CI₅₀ con respecto a PI3K δ que es al menos 50 veces, preferentemente al menos 100 veces, más preferentemente al menos 200 veces y todavía más preferentemente al menos 500 veces inferior al valor CI₅₀ con respecto a alguno o a todos los demás miembros de la familia PI3K de clase I.

Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" incluye grupos de hidrocarburos de cadena lineal y ramificada que contienen el número indicado de átomos de carbono, normalmente metilo, etilo y los grupos de butilo y propilo de cadena lineal y ramificada. El grupo de los hidrocarburos puede contener hasta 16 átomos de carbono, preferentemente de uno a ocho átomos de carbono. El término "alquilo" incluye "alquilo unido", es decir un grupo hidrocarburo policíclico o bicíclico C₅-C₁₆, por ejemplo, norbornilo, adamantilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[3.2.1]octilo, o decahidronaftilo. El término "cicloalquilo" se define como un grupo hidrocarburo C₃-C₈ cíclico, como ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y ciclopentilo.

El término "alqueno" se define de forma idéntica al "alquilo", salvo por que contienen un enlace doble carbono-carbono. "Cicloalqueno C₁₋₃" se define de forma similar al cicloalquilo, salvo porque hay un enlace doble carbono-carbono presente en el anillo.

El término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "alquileo C₁₋₃arilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene de uno a tres átomos de carbono, y sustituido con un grupo arilo.

El término "halo" o "halógeno" se define en el presente documento de modo que incluya flúor, bromo, cloro y yodo.

El término "haloalquilo" se define en el presente documento como un grupo alquilo sustituido con uno o más sustituyentes halo, ya sea flúor, cloro, bromo, yodo o combinaciones de los mismos. Del mismo modo, "halocicloalquilo" se define como un grupo cicloalquilo que tiene uno o más sustituyentes halo.

El término "arilo", sólo o combinado, se define en el presente documento como un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferentemente un grupo aromático monocíclico o policíclico, como fenilo o naftilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo "arilo" puede estar o no sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular de uno a tres, halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo. Ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, clorofenilo, fluorofenilo, aminofenilo, metilfenilo, metoxifenilo, trifluorometilfenilo, nitrofenilo, carboxifenilo y similares. Los términos "arilalquilo C₁₋₃" y "heteroarilalquilo C₁₋₃" se definen como un grupo arilo o heteroarilo que tiene un sustituyente alquilo C₁₋₃.

El término "heteroarilo" se define, en el presente documento, como un sistema de anillo monocíclico o bicíclico, que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo aromático y que puede estar no sustituido o sustituido con, por ejemplo, uno o más, y en particular de uno a tres, sustituyentes, como halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen tienilo, furilo, piridilo, oxazolilo, quinolilo, isoquinolilo, indolilo, triazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, benzotiazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, tiazolilo y tiadiazolilo.

El término "Het" se define como grupos monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo compuesto por oxígeno, nitrógeno y azufre. Un grupo "Het" también puede contener un grupo

oxo (=O) unido al anillo. Ejemplos no limitantes de grupos Het incluyen 1, 3-dioxolano, 2-pirazolina, pirazolidina, pirrolidina, piperazina, 1-pirrolina, 2H-pirano, 4H-pirano, morfolina, tiofolina, piperidina, 1,4-ditiano, y 1,4-dioxano.

El término "hidroxi" se define como -OH.

El término "alcoxi" se define como -OR, donde R es alquilo.

El término "alcoxialquilo" se define como un grupo alquilo en el que se ha sustituido un hidrógeno con un grupo alcoxi. El término " (alquiltio)alquilo" se define de forma similar a un alcoxialquilo, salvo por que hay presente un átomo de azufre, en lugar de un átomo de oxígeno.

El término "hidroxialquilo" se define como un grupo hidroxi unido a un grupo alquilo.

El término "amino" se define como -NH₂ y el término "alquilamino" se define como -NR₂, en el que al menos un R es alquilo y el segundo T es alquilo o hidrógeno.

El término "acilamino" se define como RC(=O)N, en la que R es alquilo o arilo.

El término "alquiltio" se define como -SR, donde R es alquilo.

El término "alquilsulfinilo" se define como R-SO₂, donde R es alquilo.

El término "amino" se define como -NH₂ y el término "alquilamino" se define como -NR₂, en el que al menos un R es alquilo y el segundo T es alquilo o hidrógeno.

El término "acilamino" se define como RC(=O)N, en la que R es alquilo o arilo.

El término "alquiltio" se define como -SR, donde R es alquilo.

El término "alquilsulfinilo" se define como R-SO₂, donde R es alquilo.

El término "alquilsulfonilo" se define como R-SO₃, donde R es alquilo.

El término "nitro" se define como -NO₂.

El término "trifluorometilo" se define como -CF₃.

El término "trifluorometoxi" se define como -OCF₃.

El término "ciano" se define como -CN.

El término "profármaco" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* en un compuesto con la fórmula estructural (I) mencionada anteriormente, por ejemplo, mediante hidrólisis. El diseño del profármaco se debate en términos generales en Hardma et al. (Eds.), Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 9ª ed., pp. 11-16 (1996). Un debate a fondo se proporciona en Higuchi et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems. Vol. 14. ASCD Symposium Series, y en Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design. American Pharmaceutical Association and Pergamon Press (1987). En pocas palabras, a la administración de un fármaco le sigue la eliminación del organismo o alguna biotransformación por la que la actividad biológica del fármaco se reduce o elimina. Alternativamente, un proceso de biotransformación puede provocar un subproducto metabólico, que es más activo por sí solo o igualmente activo en comparación con el fármaco inicialmente administrado. Un conocimiento más profundo de estos procesos de biotransformación permite el diseño de los denominados "profármacos" que, tras una biotransformación, se vuelven fisiológicamente más activos en su estado alterado. Por lo tanto, los profármacos comprenden compuestos farmacológicamente inactivos que se convierten en metabolitos biológicamente activos.

A modo ilustrativo, los profármacos se pueden convertir en una forma farmacológicamente activa mediante la hidrólisis de, por ejemplo, un enlace éster o amida, introduciendo de este modo o exponiendo un grupo funcional al producto resultante. Los profármacos se pueden diseñar para que reaccionen con un compuesto endógeno al objeto de formar un conjugado hidrosoluble que mejore las propiedades farmacológicas del compuesto, por ejemplo, aumentando la semivida en la circulación. Como alternativa, los profármacos se pueden diseñar para que sufran una modificación covalente en un grupo funcional con, por ejemplo, ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. El conjugado resultante puede inactivarse y excretarse en la orina o estar dotado de una mayor potencia que el compuesto parental. Los conjugados con un elevado peso molecular también se pueden excretar en la bilis, sujetos a la escisión enzimática, y volver a la circulación, aumentando así de forma efectiva la semivida biológica del compuesto originalmente administrado.

Métodos para identificar los reguladores negativos de la actividad de PI3Kδ

La proteína PIKδ, así como los fragmentos de la misma que poseen actividad biológica, se pueden utilizar para la detección selectiva de supuestos compuestos reguladores negativos con alguna de las diversas técnicas de detección selectiva de fármacos. Un regulador negativo de PI3Kδ es un compuesto que reduce o elimina la capacidad de PI3Kδ para desempeñar cualquiera de sus funciones biológicas. Un ejemplo de este compuesto es un agente que reduce la capacidad de un polipéptido PI3Kδ para fosforilar fosfatidilinositol o dirigirse a las estructuras apropiadas de una célula. La selectividad de un compuesto que regula negativamente la actividad de PI3Kδ se puede evaluar comparando su actividad sobre PIKδ con su actividad sobre otras proteínas. Los reguladores negativos selectivos incluyen, por ejemplo, anticuerpos y otras proteínas o péptidos que se unen específicamente a un polipéptido PI3Kδ, oligonucleótidos que se unen específicamente a polipéptidos PI3Kδ, y otros compuestos no peptídicos (como moléculas orgánicas sintéticas o aisladas) que interactúan específicamente con los polipéptidos PI3Kδ. Los reguladores negativos también incluyen compuestos como los descritos anteriormente, pero que interactúan con una pareja de unión específica de los polipéptidos piad.

En la actualidad, los objetivos preferibles para el desarrollo de reguladores negativos selectivos de PI3Kδ incluyen, por ejemplo:

- (1) las regiones citoplasmáticas de los polipéptidos PI3Kδ que contactan con otras proteínas y/o localizan a PI3Kδ dentro de una célula;
- 2) las regiones de los polipéptidos PI3Kδ que se unen a parejas de unión específicas;
- (3) las regiones de los polipéptidos PI3Kδ que se unen al sustrato;
- (4) los sitios reguladores alostéricos de los polipéptidos PI3Kδ que pueden interactuar directamente o no con el lugar activo tras la señal reguladora;
- (5) las regiones de los polipéptidos PI3Kδ que median en la multimerización.

Por ejemplo, un objetivo para el desarrollo de moduladores es la interacción reguladora identificada de p85 con p110δ, que puede estar implicada en la activación y/o localización subcelular de la fracción p110δ. Otros moduladores selectivos incluyen aquellos que reconocen el regulador específico o las secuencias de nucleótidos que codifican PI3Kδ. Los moduladores de la actividad de PIKδ pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y condiciones fisiológicas que implican una actividad de PI3Kδ aberrante.

Los polipéptidos PI3K humanos son aptos para ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS) realizados con células o bioquímicos de acuerdo con los métodos conocidos y practicados en la técnica, incluyendo los sistemas de ensayo con melanóforos para investigar las interacciones receptor-ligando, sistemas de ensayo con levaduras y sistemas de expresión en células de mamíferos. Para una revisión, véase Jayawick-remeand Kost, *Curr Opin Biotechnol*, 8:629-34 (1997). Los ensayos HTS miniaturizados y automatizados también se incluyen como se describe, por ejemplo, en Houston y Banks. *Curr Opin Biotechnol*, 8:734-40 (1997).

Estos ensayos HTS se utilizan para analizar bibliotecas de compuestos al objeto de identificar determinados compuestos que presentan una propiedad deseada. Se puede utilizar cualquier biblioteca de compuestos, incluyendo bibliotecas químicas, bibliotecas de productos naturales, y bibliotecas combinatorias que comprenden oligopéptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos aleatorios o diseñados.

Las bibliotecas químicas pueden contener compuestos conocidos, análogos con una estructura patentada de compuestos conocidos o compuestos identificados de estudios con productos naturales.

Las bibliotecas de productos naturales son colecciones de materiales aislados de fuentes naturales, normalmente microorganismos, animales, plantas u organismos marinos. Los productos naturales se aíslan de sus fuentes mediante fermentación de microorganismos, seguida del aislamiento y la extracción de los caldos de fermentación o mediante la extracción directa de los propios microorganismos o tejidos (plantas o animales). Las bibliotecas de productos naturales incluyen polipéptidos, péptidos no ribosomales y variantes (incluyendo variantes no presentes en la naturaleza) de los mismos. Para una revisión, véase Cane et al., *Science*. 282:63-68 (1998).

Las bibliotecas combinatorias están compuestas por grandes cantidades de compuestos relacionados, tales como péptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos en forma de mezcla. Estos compuestos son relativamente fáciles de diseñar y preparar mediante protocolos de síntesis automatizados tradicionales, PCR, clonado o métodos sintéticos patentados. Las bibliotecas combinatorias de péptidos y oligonucleótidos son particularmente interesantes.

No obstante, otras bibliotecas de interés incluyen los péptidos, proteínas, peptidomiméticos, colecciones de sintéticos multiparalelo, recombinatorios y polipéptidos. Para una revisión de la química combinatoria y las bibliotecas creadas de este modo, véase Myers, *Curr Opin Biotechnol*, 8:701-07 (1997).

Una vez que se hayan identificado compuestos que demuestran una actividad como reguladores negativos de la función de PI3Kδ, se puede realizar un programa de optimización en un esfuerzo por mejorar la potencia y selectividad

de la actividad. Este análisis de las relaciones estructura-actividad (SAR) implica normalmente una serie iterativa de modificaciones selectivas de las estructuras de los compuestos y su correlación con la actividad bioquímica o biológica. Se pueden diseñar familias de compuestos relacionados que registren toda la actividad deseada, con ciertos miembros de la familia, en concreto los que poseen unos perfiles farmacológicos adecuados, potencialmente aptos como candidatos terapéuticos.

Usos terapéuticos de los inhibidores de la actividad de PI3Kδ (como información básica y no como parte de la invención reivindicada)

La divulgación proporciona un método para inhibir de forma selectiva o específica la actividad de PI3Kδ terapéutica o profilácticamente. El método comprende la administración de un inhibidor selectivo o específico de la actividad de PI3Kδ en una cantidad efectiva del mismo. Este método se puede emplear en el tratamiento de seres humanos o animales que presentan o pueden presentar cualquier afección cuyos síntomas o patología están asociados con la actividad o expresión de PI3Kδ.

"Tratar" como se usa en el presente documento se refiere a la prevención del desarrollo de un trastorno en un animal que pueda presentar una predisposición a ese trastorno, pero al que todavía no se le haya diagnosticado; la inhibición del trastorno, es decir la detención de su desarrollo; el alivio del trastorno, es decir que causa su regresión; o la mejora del trastorno, es decir la reducción de la gravedad de los síntomas asociados con el trastorno. Se entiende que "trastorno" abarca trastornos médicos, enfermedades, afecciones, síndromes y similares, sin limitación.

Los métodos de la invención abarcan diversos modos de tratamiento de un animal, preferentemente un mamífero, más preferentemente un primate e idealmente un ser humano. Entre los animales mamíferos que se pueden tratar se encuentran, por ejemplo, animales de compañía (mascotas), incluyendo perros y gatos; animales de granja, incluyendo ganado, caballos, ovejas, cerdos y cabras; animales de laboratorio, incluyendo ratas, ratones, conejos y cobayas, y primates no humanos y ejemplares del zoo. Los animales no mamíferos incluyen, por ejemplo, aves, peces, reptiles y anfibios.

En un aspecto, el método se puede emplear para tratar sujetos terapéutica o profilácticamente que padezcan o pueden padecer un trastorno inflamatorio. Un aspecto se deriva de la implicación de PI3Kδ en los aspectos mediadores del proceso inflamatorio. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se ha teorizado que, dado que la inflamación implica procesos normalmente mediados por los leucocitos (por ejemplo, neutrófilos, linfocitos, etc.), la activación y la trans migración quimiotáctica, y dado que la PI3Kδ puede mediar en estos fenómenos, los antagonistas de PI3Kδ se pueden utilizar para contener las lesiones asociadas con la inflamación.

"Trastorno inflamatorio" como se usa en el presente documento se puede referir a cualquier enfermedad, trastorno o síndrome en el que una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada provoque unos síntomas inflamatorios excesivos, daños en el tejido del huésped o pérdida de función tisular. "Trastorno inflamatorio" también se refiere a un estado patológico mediado por el influjo de leucocitos y/o la quimiotaxis de neutrófilos.

"Inflamación" como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta de protección localizada provocada por lesiones o por la destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o aislar tanto el agente perjudicial como el tejido dañado. La inflamación está particularmente asociada con el influjo de leucocitos y/o la quimiotaxis de neutrófilos. La inflamación puede ser el resultado de una infección por organismos patógenos y virus, y de medios no infecciosos, como traumatismos o reperusión, tras un ictus o infarto de miocardio, como respuesta inmunológica a un antígeno extraño y respuestas autoinmunitarias. Por consiguiente, los trastornos inflamatorios abarcan trastornos asociados con reacciones del sistema de defensa específico así como con reacciones del sistema de defensa no específico.

La expresión "sistema de defensa específico", como se usa en el presente documento, se refiere al componente del sistema inmunológico que reacciona ante la presencia de antígenos específicos. Entre los ejemplos de inflamación resultantes de una respuesta del sistema de defensa específico se incluyen la respuesta clásica a antígenos extraños, enfermedades autoinmunes y la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada mediada por las células T. Enfermedades inflamatorias crónicas, el rechazo de órganos y tejidos trasplantados sólidos, como los trasplantes de médula ósea y de riñón, y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH) son otros ejemplos de reacciones inflamatorias del sistema de defensa específico.

La expresión "sistema de defensa no específico" como se usa en el presente documento se refiere a trastornos inflamatorios mediados por leucocitos que no tienen memoria inmunológica (como granulocitos y macrófagos). Entre los ejemplos de la inflamación resultante, al menos en parte, de una reacción del sistema de defensa no específico se incluyen la inflamación asociada con afecciones tales como el síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto (SDRA) o síndromes de lesión en múltiples órganos, lesiones de reperusión, glomerulonefritis aguda, artritis reactiva, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, tales como meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, tales como accidente cerebrovascular, lesiones térmicas, enfermedades inflamatorias del intestino, síndromes asociados con la transfusión de granulocitos y toxicidad inducida por citocinas.

"Enfermedad autoinmune" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión tisular esté asociada con respuestas humorales o mediadas por células a los propios componentes del organismo. "Enfermedad alérgica" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier síntoma, daño tisular o pérdida de función tisular resultante por la alergia. "Enfermedad artrítica" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier enfermedad caracterizada por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a diversas etiologías. "Dermatitis", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de una amplia familia de enfermedades de la piel caracterizadas por la inflamación de la piel atribuible a diversas etiologías. "Rechazo de trasplante" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier reacción inmunológica dirigida contra el tejido injertado, como órganos o células (por ejemplo, médula ósea) caracterizada por la pérdida de función del tejido injertado y los tejidos circundantes, dolor, tumefacción, leucocitosis y trombocitopenia.

Los métodos terapéuticos de la presente divulgación incluyen métodos para el tratamiento de trastornos asociados con la activación de células inflamatorias. "Activación de células inflamatorias" se refiere a la inducción mediante un estímulo (incluyendo, entre otros, citocinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo, a entre otros, citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoïdes o aminos vasoactivas), o la expresión en la superficie de la célula de mediadores nuevos o en cantidades aumentadas (incluyendo, entre otros, antígenos de histocompatibilidad mayor o moléculas de adhesión a células) en células inflamatorias (incluyendo, entre otros, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (es decir, leucocitos polimorfonucleares, como neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los expertos en la técnica apreciarán que la activación de uno de estos fenotipos o de una combinación de ellos en estas células puede contribuir al inicio, perpetuación o empeoramiento de un trastorno inflamatorio.

Se ha descubierto que los compuestos de la invención inhiben la liberación de superóxido por parte de los neutrófilos. El superóxido es liberado por los neutrófilos en respuesta a diversos estímulos, entre los que se incluyen los signos de infección, como un mecanismo de eliminación de células. Por ejemplo, se sabe que la liberación de superóxido está inducida por el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), que es liberado por los macrófagos, mastocitos y linfocitos tras el contacto con los componentes bacterianos de la pared de la célula, tales como liposacáridos (LPS). El $TNF\alpha$ es un activador extraordinariamente potente y promiscuo de los procesos inflamatorios, participando en la activación de los neutrófilos y varios otros tipos de células, la inducción de la adhesión de leucocitos/células endoteliales, pirexia, aumento de la producción de MHC clase I y estimulación de la angiogénesis. Como alternativa, la liberación de superóxido puede estimularse por acción de formil-metionil-leucina-fenilalanina (fMLP) u otros péptidos bloqueados en el N-terminal mediante metionina formilada. Por lo general estos péptidos no se encuentran en eucariotas, sino que son fundamentalmente característicos de las bacterias e indican la presencia de bacterias en el sistema inmunológico. Los leucocitos que expresan el receptor de fMLP, como los neutrófilos y macrófagos, son estimulados para que migren a los gradientes de estos péptidos (es decir, quimiotaxis) hacia los lugares de la infección. Como se ha demostrado en el presente documento, los compuestos de la invención inhiben la liberación de superóxido estimulada por los neutrófilos en respuesta a $TNF\alpha$ o fMLP. También se ha demostrado que otras funciones de los neutrófilos, incluyendo la estimulación de la exocitosis y la migración quimiotáctica dirigida, son inhibidas por los inhibidores PI3K δ de la invención. Por consiguiente, cabe esperar que los compuestos de la invención sean útiles para tratar trastornos, tales como los trastornos inflamatorios mediados por cualquiera de estas funciones de los neutrófilos o por todas ellas.

La presente invención proporciona métodos para tratar trastornos como las enfermedades artríticas, tales como artritis reumatoide, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis, enfermedad de Behcet, septicemia, shock séptico, shock endotóxico, septicemia por gramnegativos, septicemia por grampositivos y síndrome del shock tóxico; síndrome de disfunción orgánica múltiple secundario a una septicemia, traumatismo o hemorragia; trastornos oftálmicos, como conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y oftalmopatía asociada con la tiroides; granuloma eosinófilico; trastornos respiratorios o pulmonares, tales como asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica SDRA, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasia y toxicidad del oxígeno del pulmón; lesión de reperfusión de miocardio, cerebro o extremidades; fibrosis, tales como fibrosis quística; formación de queloides o formación de tejido cicatricial; aterosclerosis; enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Reynaud; trastornos de rechazo de trasplantes, tales como EICH y rechazo de aloinjertos; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino, tales como enfermedad intestinal inflamatoria crónica (EIIIC), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; dermatosis inflamatoria, tales como dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis o urticaria; fiebre y mialgias debido a una infección; trastornos inflamatorios del sistema nervioso central o periférico, tales como meningitis, encefalitis, y lesiones cerebrales o de la médula espinal debido a traumatismos leves; síndrome de Sjögren; enfermedades que implican una diapedesis leucocitaria; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; shock hipovolémico; diabetes mellitus de tipo I; hipersensibilidad aguda y retardada; enfermedades provocadas discrasia leucocitaria y metástasis; lesión térmica; síndromes asociados con la transfusión de granulocitos y toxicidad inducida por citocinas.

Los compuestos pueden tener utilidad en el tratamiento de sujetos que están, o pueden estar, sujetos a lesión por reperfusión, es decir la lesión resultante por situaciones en las que un órgano o tejido experimenta un periodo de isquemia seguida de reperfusión. El término "isquemia" se refiere a una anemia localizada de un tejido debido a la

obstrucción del flujo entrante de sangre arterial. Una isquemia temporal seguida de una reperfusión provoca característicamente una activación de los neutrófilos y la transmigración por el endotelio de los vasos sanguíneos en la zona afectada. La acumulación de neutrófilos activados, a su vez, provoca la generación de metabolitos del oxígeno reactivos, que dañan los componentes del tejido u órgano afectado. Este fenómeno de "lesión por reperfusión" está normalmente se asocia con afecciones tales como ictus vascular (incluyendo isquemia focal y global), shock hemorrágico, isquemia o infarto de miocardio, trasplante de órganos y vasoespasmo cerebral. A título ilustrativo, la lesión por reperfusión se produce a la conclusión de los procedimientos de derivación coronaria o durante una parada cardiaca cuando el corazón, después de haber dejado de recibir sangre, comienza a reperfundir. Se espera que la inhibición de la actividad de PI3K δ resulte en una disminución de las lesiones por reperfusión en estas situaciones.

Con respecto al sistema nervioso, la isquemia global se produce cuando el flujo de sangre de todo el cerebro se interrumpe durante un período. La isquemia global puede ser consecuencia de una parada cardiaca. La isquemia focal se produce cuando una parte del cerebro se ve privada de su suministro de sangre normal. La isquemia focal puede ser resultado de una oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, un traumatismo craneoencefálico, un edema o un tumor cerebral. Incluso cuando sea temporal, la isquemia focal y global puede provocar importantes daños neuronales. A pesar de que el daño en el tejido nervioso se produce durante horas o incluso días después del inicio de isquemia, se pueden desarrollar algunos daños permanentes en los tejidos y nervios en los primeros minutos tras la interrupción del flujo de sangre del cerebro.

También se puede producir isquemia en el corazón en el infarto de miocardio y otros trastornos cardiovasculares en los que las arterias coronarias se obstruyen como resultado de una aterosclerosis, un trombo o espasmo. De acuerdo con lo anterior, se cree que la invención resultará útil para el tratamiento de daños en el tejido cardiaco, particularmente los daños resultantes de la isquemia cardiaca o causados por lesiones de reperfusión en mamíferos.

En otro aspecto, los inhibidores selectivos de la actividad de PI3K δ , tales como los compuestos de la invención, se pueden emplear en métodos para el tratamiento de enfermedades óseas, especialmente enfermedades en las que la función del osteoclasto es anómala o indeseable. Como se muestra en el Ejemplo 6, más adelante, los compuestos de la invención inhiben la función de los osteoclastos *in vitro*. De acuerdo con lo anterior, el uso de estos compuestos y otros inhibidores selectivos de PI3K δ puede resultar útil para el tratamiento de la osteoporosis, la enfermedad de Paget y otros trastornos de reabsorción ósea relacionados.

En un aspecto adicional, la invención incluye métodos para utilizar compuestos inhibidores de PI3K δ para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerígenas de origen hematopoyético, preferentemente células cancerígenas de origen linfóide y más preferentemente células cancerígenas relacionadas o derivadas de linfocitos B o progenitores de linfocitos B. Los tipos de cáncer aptos para el tratamiento utilizando los compuestos de la invención incluyen, sin limitaciones, linfomas, por ejemplo neoplasias malignas de tejidos linfoides y reticuloendoteliales, tales como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfomas linfocíticos y similares; mielomas múltiples; así como leucemias, tales como leucemias linfocíticas, leucemias (mielógenas) mieloides crónicas y similares. En una realización preferida, los compuestos inhibidores de PI3K δ se pueden utilizar para inhibir o controlar el crecimiento o la proliferación de células de leucemia (mielógena) mielóide crónica.

En otro aspecto, la divulgación incluye un método para suprimir una función de los basófilos y/o mastocitos y, por lo tanto, permite el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una actividad excesiva o indeseable de los basófilos y/o mastocitos. De acuerdo con el método, se puede utilizar un compuesto que inhiba selectivamente la expresión o actividad de fosfatidilinositol 3-quinasa delta (PI3K δ) en los basófilos y/o mastocitos. Preferentemente, el método emplea un inhibidor de PI3K δ en una cantidad suficiente para inhibir la liberación de histamina estimulada por parte de los basófilos y/o mastocitos. De acuerdo con lo anterior, el uso de estos compuestos y otros inhibidores selectivos de PI3K δ pueden resultar útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la liberación de histamina, tales como trastornos alérgicos, incluyendo trastornos como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, SDRA, enfisema y trastornos relacionados.

Composiciones farmacéuticas de los inhibidores de la actividad de PI3K δ

Un compuesto de la presente invención se puede administrar como producto químico puro, aunque normalmente es preferible administrar el compuesto en forma de una formulación o composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto químico o biológico ("agente") que es activo como modulador de la actividad de PI3K δ y un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéutico biocompatible. La composición puede incluir el agente como la única fracción activa o en combinación con otros agentes, tales como oligo o polinucleótidos, oligo o polipéptidos, fármacos u hormonas mezcladas con un excipiente o excipientes u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos y otros ingredientes se pueden considerar farmacéuticamente aceptables en la medida en que sean compatibles con otros ingredientes de la formulación y no sean perjudiciales para el receptor de los mismos.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas en Remington's Pharmaceutical Sciences. 18^a Ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990. Las composiciones farmacéuticas de la

presente invención se pueden fabricar utilizando cualquier método convencional, por ejemplo mezclado, disolución, granulado, elaboración de grageas, levigación, emulsificación, encapsulación, atrapamiento, solidificación rápida, secado por atomización o procesos de liofilización. No obstante, la formulación farmacéutica óptima será determinada por un profesional en la técnica dependiendo de la vía de administración y de la dosis deseada. Dichas formulaciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la velocidad de la liberación in vivo y la velocidad del aclaramiento in vivo de los agentes administrados. Dependiendo de la afección que se esté tratando, estas composiciones farmacéuticas se pueden formular y administrar por vía sistémica o local.

Las composiciones farmacéuticas se formulan de forma que contengan vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente pueden contener excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en las preparaciones que se pueden utilizar con fines farmacéuticos. Por lo general, la modalidad de administración determinará la naturaleza del vehículo. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Los vehículos adecuados para la administración parenteral se pueden seleccionar de entre soluciones salinas, soluciones salinas tampón, dextrosa, agua y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los vehículos preferibles para la administración parenteral son tampones fisiológicamente compatibles, tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o una solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración tisular o celular, en la formulación se usan penetrantes adecuados para atravesar la barrera concreta. Estos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para las preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizadores, tales como polioles (por ejemplo, sacarosa) y/o tensioactivos (por ejemplo, tensioactivos no iónicos) y similares.

Como alternativa, las formulaciones para uso parenteral pueden comprender dispersiones o suspensiones de los compuestos activos elaborados en forma de suspensiones inyectables oleaginosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo y ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados para aumentar la solubilidad de los compuestos y permitir la preparación de soluciones muy concentradas. También se pueden utilizar polímeros acuosos que proporcionan una solubilización sensible al pH y/o una liberación sostenida del agente activo como revestimientos o estructuras matriz, por ejemplo, polímeros metacrílicos, tales como la serie EUDRAGIT® disponible en Röhm America Inc. (Piscataway, NJ). También se pueden utilizar emulsiones, por ejemplo dispersiones de aceite en agua y agua en aceite, opcionalmente estabilizadas con un agente dispersante o emulsionante (materiales de superficie activa; tensioactivos). Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión como alcoholes de isostearyl etoxilado, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, goma tragacanto y mezclas de los mismos.

También se pueden utilizar liposomas que contienen el agente activo para la administración. Por lo general, los liposomas se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Las composiciones en forma de liposoma también pueden contener otros ingredientes, como estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferibles incluyen fosfolípidos fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*. Vol. XIV, p. 33. Academic Press. New York (1976).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente en dosis apropiadas para la administración oral se pueden formular utilizando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Las preparaciones formuladas para la administración oral pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas, grageas, trociscos, líquidos, geles, jarabes, pastas, elixires, suspensiones o polvos. A título ilustrativo, las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante combinación de compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, tras añadir las sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener núcleos de comprimidos o núcleos de grageas. Las formulaciones orales pueden emplear vehículos líquidos de tipo similar a las descritas para uso parenteral, como soluciones acuosas tampón, suspensiones y similares.

Las formulaciones orales preferibles incluyen comprimidos, grageas y cápsulas de gelatina. Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes, entre los que se incluyen, sin limitaciones:

- a) diluyentes, como azúcares, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol;
- b) aglutinantes, como silicato de aluminio de magnesio, almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc.;
- c) materiales de celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, gomas, tales como goma arábica y goma tragacanto, y proteínas, como gelatina y colágeno;
- d) agentes de desintegración o solubilización, como polivinilpirrolidona reticulada, almidones, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tales como alginato sódico o composiciones efervescentes;
- e) lubricantes, como sílice, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o calcio, y polietilenglicol;
- f) aromatizantes y edulcorantes;
- g) colorantes o pigmentos, por ejemplo para identificar el producto o caracterizar la cantidad (dosis) del compuesto activo; y

h) otros ingredientes, como conservantes, estabilizantes, agentes expansores, agentes emulsionantes, promotores de la solución, sales para la regulación de la presión osmótica y tampones.

5 Las cápsulas de gelatina incluyen cápsulas de tipo de ajuste por presión fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas fabricadas de gelatina y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de tipo de ajuste por presión pueden contener el o los ingredientes o activos mezclados con cargas, aglutinantes, lubricantes y/o estabilizantes, etc. En las cápsulas blandas, los componentes activos se pueden disolver o suspender en líquidos apropiados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizantes.

10 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados, tales como soluciones de azúcar concentrado, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes.

15 La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal del agente activo. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que las correspondientes formas en base o ácido libre. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Los compuestos que contienen restos ácidos pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con los cationes apropiados. Los cationes farmacéuticamente aceptables apropiados incluyen, por ejemplo, cationes de metales alcalinos (por ejemplo, sodio o potasio) y cationes de metales alcalinotérreos (tales como calcio o magnesio).

20 Los compuestos de la fórmula estructural (I) que contienen restos básicos pueden formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con los ácidos apropiados. Por ejemplo, Berge et al. describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J Pharm Sci, 66:1 (1977). Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido adecuado.

25 Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato; digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formiato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, mesitilenosulfonato, metanosulfonato o sulfato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato o hidrógenofosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

35 En vista de lo anterior, con cualquier referencia a los compuestos de la presente invención que aparece en el presente documento se pretende incluir los compuestos de la fórmula estructural (I)-(V), así como solvatos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

40 Se pueden preparar *in situ* sales de adición básicas durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la presente invención haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables incluyen cationes basados en metales alcalinos o en metales alcalinotérreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y de aluminio, y cationes de amonio cuaternario no tóxico y de aminas, incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, dietilamonio, trietilamonio. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básicas incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina.

50 Los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo, sulfatos de dialquilo como sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo, haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de arilquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De este modo se obtienen productos con una dispersibilidad o solubilidad modificada.

55 Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéutico aceptable se pueden preparar, introducir en un contenedor adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección para la que están indicadas. De acuerdo con lo anterior, también se contempla un artículo de fabricación, como un recipiente que comprende una forma de dosificación de un compuesto de la invención y una etiqueta que contiene instrucciones de uso del compuesto. Los kits también se contemplan en la invención. Por ejemplo, el kit puede comprender una forma de dosificación de una composición farmacéutica y un prospecto que contiene instrucciones de uso de la composición en el tratamiento de una afección médica. En cualquier caso, las afecciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de trastornos inflamatorios, cáncer, etc.

65 **Métodos de administración de los inhibidores de la actividad de PI3Kδ**

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la actividad de PI3K δ se pueden administrar al sujeto por cualquier método convencional, incluyendo técnicas enterales y parenterales. Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las que la composición se administra por una vía distinta a la del tracto gastrointestinal, por ejemplo, por vía intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramedular, intramuscular, intraarticular, intratecal e inyecciones intraventriculares. Las modalidades de administración enteral incluyen, por ejemplo, la administración oral (incluyendo bucal y sublingual) y rectal. Las modalidades de administración transepitelial incluyen, por ejemplo, administración transmucosa y administración transdérmica. La administración transmucosa incluye, por ejemplo, administración enteral, así como administración nasal, inhalación y pulmonar profunda; administración vaginal y administración rectal. La administración transdérmica incluye modalidades transcutáneas o transdérmicas activas o pasivas, incluyendo, por ejemplo, parches y dispositivos de iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, pomadas o ungüentos. La administración parenteral también se puede realizar con una técnica de alta presión, por ejemplo POWDERJECT®.

Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones depot (depósito), bombas osmóticas y similares. Una vía preferible de la administración para el tratamiento de la inflamación puede ser la administración local o tópica para los trastornos localizados, tales como artritis, o la administración sistémica para los trastornos diseminados, por ejemplo la administración intravenosa para la lesión por reperfusión o para estados sistémicos como la septicemia. Para otras enfermedades, incluyendo aquellas que afectan al tracto respiratorio, por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y enfisema, la administración se puede realizar mediante inhalación o administración pulmonar profunda de atomizadores, aerosoles, polvos y similares.

Para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente leucemias y otros cánceres diseminados, normalmente es preferible la administración parenteral. Serían deseables formulaciones de los compuestos para optimizarlos para la biodistribución tras la administración parenteral. Los compuestos inhibidores de PI3K δ se pueden administrar antes, durante o después de la administración de quimioterapia, radioterapia y/o cirugía.

Por otra parte, el índice terapéutico de los compuestos inhibidores de PI3K δ se puede mejorar modificando o derivatizando los compuestos para la liberación dirigida en las células cancerígenas que expresan un marcador que identifica las células como tales. Por ejemplo, los compuestos se pueden unir a un anticuerpo que reconoce un marcador que es selectivo o específico de las células cancerígenas, de forma que los compuestos sean llevados junto a las células para que ejerzan sus efectos localmente, como se ha descrito anteriormente, véase, por ejemplo, Pietersz et al., *Immunol Rev*, 129:57 (1992); Trail et al., *Science*, 261:212 (1993); y Rowlinson-Busza et al., *Curr Opin Oncol*, 4:1142 (1992)). La liberación dirigida al tumor de estos compuestos mejora el beneficio terapéutico, entre otras cosas, minimizando las posibles toxicidades no específicas que pueden resultar del tratamiento con radiación o quimioterapia. En otro aspecto, los compuestos inhibidores de PI3K δ y radioisótopos o agentes quimioterapéuticos se pueden conjugar con el mismo anticuerpo contra el tumor.

Para el tratamiento de los trastornos de reabsorción ósea o trastornos mediados por osteoclastos, los inhibidores de PI3K δ se pueden administrar por cualquier método apropiado. La administración focal puede ser deseable, como la inyección intraarticular. En algunos casos, puede ser deseable acoplar los compuestos a un resto que pueda dirigir los compuestos al hueso. Por ejemplo, un inhibidor de PI3K δ se puede acoplar con compuestos con una gran afinidad por la hidroxiapatita, que es un componente principal del hueso. Esto se puede realizar, por ejemplo, adaptando un método de acoplamiento a la tetraciclina desarrollado para la liberación dirigida de estrógenos al hueso (Orme et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 4(11): 1375-80 (1994)).

Para que sean terapéuticamente efectivos en la modulación de los objetivos del sistema nervioso central, los agentes utilizados en los métodos de la invención deberían penetrar rápidamente en la barrera hematoencefálica cuando se administran periféricamente. No obstante, los compuestos que no pueden penetrar en la barrera hematoencefálica también pueden ser administrarse con eficacia por vía intravenosa.

Como se ha señalado, las características del propio agente y la formación del agente pueden influir en el estado físico, la estabilidad, el índice de liberación *in vivo* y el índice de eliminación *in vivo* del agente administrado. Esta información farmacocinética y farmacodinámica se puede recopilar a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, y confirmarse posteriormente en seres humanos durante el transcurso de ensayos clínicos. Por tanto, para cualquier compuesto usado en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos bioquímicos y/o basados en células. A continuación, la dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en la circulación deseable que module la expresión o actividad de PI3K δ . Cuando se realicen estudios con humanos, se obtendrá más información relativa a los niveles de la dosis adecuada y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y afecciones.

La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL₅₀ (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, que normalmente se expresa como la relación

DE₅₀/DL₅₀. Se prefieren los compuestos que presentan unos elevados índices terapéuticos, es decir en los que la dosis tóxica es sustancialmente superior a la dosis efectiva. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales adicionales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. Las dosis de tales compuestos están, preferentemente, dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE₅₀ con poca o nula toxicidad.

Para los métodos de la invención, se puede utilizar cualquier régimen de administración efectivo que regule los tiempos y la secuencia de las dosis. Las dosis del agente incluyen preferentemente unidades de dosis farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva del agente. Como se usa en el presente documento, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de PI3K δ y/o provocar un cambio mensurable en un parámetro fisiológico del sujeto mediante la administración de una o más unidades de dosis farmacéuticas.

Ejemplos de niveles de dosis para un sujeto humano van desde aproximadamente 0,001 miligramos del agente activo por kilogramo de peso corporal (mg/kg) hasta aproximadamente 100 mg/kg. Normalmente, las unidades de dosis del agente activo comprenden desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 10.000 mg, preferentemente desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1.000 mg, dependiendo de la indicación, vía de administración, etc. Dependiendo de la vía de administración se podrá calcular una dosis adecuada con arreglo al peso corporal, la superficie corporal o el tamaño del órgano. El médico encargado de la atención determinará la pauta posológica final, considerando varios factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la identidad y la gravedad del estado de enfermedad, y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, la afección, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, y la gravedad de cualquier infección. Otros factores que se pueden tener en cuenta son el tiempo y la frecuencia de administración, las combinaciones del fármaco, las sensibilidades a la reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Un ajuste más preciso de la dosis apropiada para el tratamiento en el que participa cualquiera de las formulaciones mencionadas en el presente lo realiza de forma rutinaria el médico especializado sin una experimentación excesiva, especialmente en vista de la información de la dosis y los ensayos divulgados, así como de los datos farmacocinéticos observados en ensayos clínicos con seres humanos. Las dosis apropiadas se pueden averiguar mediante el uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con los datos de respuesta a la dosis.

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y la vía de administración. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. De acuerdo con lo anterior, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una dosis única, múltiples dosis discretas, infusión continua, liberación sostenida, depot o combinaciones de los mismos, conforme sea necesario para mantener el nivel mínimo deseado del agente. Las composiciones farmacéuticas de actuación corta (es decir, con una semivida corta) se pueden administrar una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día). Las composiciones farmacéuticas de acción larga podrían administrarse cada 3 o 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Las bombas, tales como las bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales, pueden ser preferibles para la infusión continua.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a entender la invención y presuponen un conocimiento de los métodos convencionales bien conocidos por las personas con unos conocimientos normales en la técnica a la que pertenecen los ejemplos, por ejemplo la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de polipéptidos de codificación genética en estos vectores y plásmidos, o la introducción de vectores y plásmidos en células huésped. Estos métodos se describen con detalle en numerosas publicaciones, entre las que se incluyen, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Ausubel et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. (1994); y Ausubel et al. (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*. 4^a ed., John Wiley & Sons, Inc. (1999). Las condiciones y los materiales concretos descritos a continuación tienen por objeto ilustrar determinados aspectos de la invención.

EJEMPLO 1

Preparación y purificación de PI3K α , β , y δ recombinante

Los complejos heterodiméricos de PI3K recombinante compuestos por una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85 se sobreexpresaron empleando el sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC[®] HT (GIBCO/BRL), y después se purificaron para su uso en ensayos bioquímicos. Las cuatro PI 3-quinetas de clase I se clonaron en vectores de baculovirus del siguiente modo:

p110 δ : Una versión marcada con FLAG[®] de p110 δ humana (SEC ID N^o 1) (véase Chantry et al., *J Biol Chem*, 272:19236-41 (1997)) se subclonó utilizando técnicas de ADN recombinante estándar en el sitio *BamHI-XbaI* del vector de expresión de la célula del insecto pFastbac HTb (Life Technologies, Gaithersburg, MD), de modo que el clon estaba en el mismo marco de lectura que la marca His del vector. El sistema FLAG[®] se describe en las patentes de EE.UU. 4.703.004; 4.782.137; 4.851.341; y 5.011.912, y los reactivos están disponibles en Eastman Kodak Co.

p110 δ : de manera similar al método utilizado para p110 δ , anteriormente descrito, una versión marcada con FLAG[®] de p110 α (véase Volinia et al., *Genomics*, 24 (3):427-477 (1994)) se subclonó en los sitios *BamHI-HindIII* de

pFastbac HTb (Life Technologies) de modo que el clon estaba en el mismo marco de lectura que la marca His del vector.

p110β: Un clon de p110β (véase Hu et al., Mol Cell Biol, 13:7677-88 (1993)) se amplificó a partir de la biblioteca de ADNc esplénico humano MARATHON® Ready (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante empleando los siguientes cebadores:

Cebador en 5':

5' -

GATCGAATTCGGCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGCTTC

AGTTTCATAATGCCTCC-3' (SEC ID N° 3)

Cebador en 3':

5'-GATCGCGGCCGCTTAAGATCTGTAGTCTTTCCGAACTGTGTG-3' (SEC ID N° 4)

El cebador EN 5' se creó para contener una marca FLAG® en el mismo marco de lectura que la secuencia p110β. Tras la amplificación, la secuencia FLAG®-p110β se subclonó utilizando técnicas recombinantes estándar en los sitios *EcoRI-NotI* de pFastbac HTa (Life Technologies), de forma que el clon estaba en el mismo marco de lectura que la marca His del vector.

p110γ: El ADNc de p110γ (véase Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)) se amplificó a partir de una biblioteca de ADNc de bazo humano Marathon Ready (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante, utilizando los siguientes cebadores:

Cebador en 5':

5'-AGAATGCGGCCGCATGGAGCTGGAGAACTATAAACAGCCC-3' (SEC ID N° 5)

Cebador en 3':

5'-CGCGGATCCTTAGGCTGAATGTTTCTCTCCTTGTGG-3' (SEC ID N° 6)

Posteriormente se añadió una marca FLAG® al extremo 5' de la secuencia p110γ y se clonó en los sitios *BamHI-SpeI* de pFastbac HTb (Life Technologies) utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, con la secuencia FLAG®-p110γ en el mismo marco de lectura que la marca His del vector.

p85α: Un fragmento *BamHI-EcoRI* de ADNc de p85 marcado con FLAG® (véase Skolnik et al., Cell. 65:83-89 (1991)) se subclonó en los sitios *BamHI-EcoRI* del vector pFastbac dual (Life Technologies).

Los baculovirus recombinantes que contienen los anteriores clones se generaron utilizando el protocolo recomendado del fabricante (Life Technologies). Los baculovirus que expresan la subunidad catalítica marcada con His p110α, p110β, o p110δ y la subunidad p85 fueron coinfectados en células de insecto Sf21. Para enriquecer el complejo enzimático heterodimérico, una cantidad excesiva de baculovirus que expresaba la subunidad p85 se infectó y el complejo de la subunidad catalítica p110 marcada con His y p85 se purificó en una columna de afinidad del níquel. Dado que p110γ no se asocia con p85, las células Sf21 se infectaron con baculovirus recombinantes que expresan solamente p110γ marcada con His. En un planteamiento alternativo, p101 se puede clonar en baculovirus, para permitir la coexpresión con su elemento de unión preferible p110γ.

Las células Sf21 72 horas después de la infección (3 litros) se recogieron y homogeneizaron en un tampón hipotónico (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,8 KCl 5 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN), utilizando un homogeneizador Dounce. Los homogeneizados se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes también se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos, seguido de una ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos. La fracción soluble se cargó inmediatamente en 10 ml de una columna de afinidad de níquel HITRAP® (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada con 50 ml del Tampón A (HEPES-KOH 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM). La columna se lavó ampliamente con Tampón A y se eluyó con un gradiente lineal de 10-500 mM de imidazol. La subunidad p85 libre se eliminó de la columna durante la etapa de lavado y solamente el complejo enzimático heterodimérico se eluyó a imidazol 250 mM. Las fracciones alícuotas de níquel se analizaron mediante electroforesis en gel de propilacrilamida SDS 10 % (SDS-PAGE), se tiñeron con SYPRO® Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y se cuantificaron con STORM® PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Las fracciones activas se combinaron y se cargaron directamente en una columna de heparina de 5 ml Hi-trap preequilibrada con el Tampón B que contiene HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, ditiotreitól 2 mM (DTT). La columna se lavó con 50 ml de Tampón B y eluyó un gradiente lineal de NaCl 0,05-2 M. Un único pico que contenía el complejo de la enzima PI3K eluido a NaCl 0,8 M. El análisis del gel de SDS-poliacrilamida demostró que las fracciones de la enzima PI3K purificadas contenían un complejo estequiométrico 1:1 de las subunidades p110 y p85. El perfil de la proteína del complejo enzimático durante la cromatografía de heparina se correspondía con el de la actividad de la

quinasa lipídica. Las fracciones activas se combinaron y congelaron en nitrógeno líquido.

EJEMPLO 2

5 Análisis de alta resolución (HTS) de PI3Kδ y ensayo de selectividad

Se realizó un análisis de alta resolución de una biblioteca química patentado para identificar los posibles inhibidores de la actividad de PI3Kδ. PI3Kδ cataliza una fototransferencia de γ - ^{32}P JATP a liposomas PIP₂/PS en la posición D3' del anillo de inositol lípido PIP₂. Esta reacción es dependiente de MgCl₂ y se inactiva con un tampón de fosfato de potasio de alta molaridad con un pH 8, 0 que contiene EDTA 30 mM. En el análisis, esta reacción se realiza en presencia o ausencia de compuestos de la biblioteca. Los productos de la reacción (y todos los productos no marcados) son transferidos a una placa de filtración de PVDF precalentada de 96 pocillos, se filtraron y se lavaron con fosfato de potasio de alta molaridad. Se añade agente de centelleo a los pocillos secados y la radioactividad incorporada se cuantifica.

La mayoría de las operaciones de ensayo se realizaron utilizando una estación de trabajo robótica BIOMEK® 1000 (Beckman) y todas las placas se leyeron utilizando protocolos de recuento de placas de centelleo líquido de Wallac.

Los inventarios del ensayo de 3X del sustrato y la enzima se realizaron y almacenaron en una cubeta (para ensayos robóticos) o una placa de propileno de fondo V y 96 pocillos (para ensayos manuales). Los reactivos fueron estables durante al menos tres horas a temperatura ambiente.

El sustrato 3X para HTS contenía Na₂ATP 0,6 mM, 0,10 mCi/ml de γ - ^{32}P JATP (NEN, Pittsburgh, PA), liposomas de PIP₂/PS 6 μM (Avanti Polar Lipids, Inc., Atlanta, GA), en HEPES 20 mM, pH 7,4.

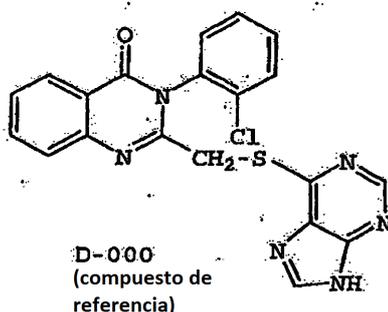
La reserva la enzima 3X para HTS contenía PI3Kδ 1,8 nM, 150 $\mu\text{g/ml}$ de IgG de caballo (utilizada únicamente como estabilizador), MgCl₂ 15 mM, DTT 3 mM en HEPES 20 mM a pH 7,4.

Las muestras del banco (conteniendo cada una un grupo de 22 compuestos) del análisis de alta resolución (HTS) químico en sulfóxido de dimetilo (DMSO) se diluyeron a 18,75 μM o 37,8 μM en agua bidestilada y se introdujeron 20 μl de las diluciones en los pocillos de una placa de polipropileno de 96 pocillos para el ensayo. El control inhibitor negativo (o control enzimático positivo) fue DMSO diluido en agua y los controles inhibidores positivos emplearon concentraciones de LY294002 suficientes para proporcionar una inhibición del 50 % y 100 %.

A las diluciones de la biblioteca química combinadas de 20 μl se añadieron de 20 μl de sustrato 3X. La reacción se inició con 20 μl de la enzima 3X y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esta dilución estableció una concentración final de 200 μM de ATP en el volumen de reacción. La reacción se detuvo con 150 μl de tampón de inactivación (fosfato de potasio 1,0 M, pH 8,0, EDTA 30 mM). Una parte de la solución inactivada (180 μl) se transfirió después a una placa de filtro de PVDF (Millipore #MAIP NOB prehumedecida con lavados secuenciales de 200 μl de 100 % de metanol, agua, y, finalmente, un tampón de lavado de fosfato de potasio 1,0 M a pH 8, 0).

La placa de filtro de PVDF se aspiró a un vacío moderado (2-5 mmHg), se lavó con 5 x 200 μl de tampón de lavado, y después se secó por aspiración. El filtro se transfirió después, se dejó secar al aire por completo y se insertó en un casete de recuento Wallac con 50 μl de un cóctel de centelleo Ecoscint añadido por pocillo. Se cuantificó la radioactividad incorporada y se analizaron los datos, tras la normalización con respecto al control positivo de la enzima (fijado al 100 %), para identificar la intersección de la curva al valor de inhibición del 50 % para estimar los valores de CI₅₀ para los inhibidores.

Un total de 57 pocillos maestros combinados se seleccionaron para la desconvolución, basándose en criterios combinados de <42 % de actividad residual en la concentración analizada y un índice de acierto total aceptado no superior a 0,2 %. A 22 compuestos por pocillo, se identificó un total de 1.254 compuestos a través de esta desconvolución y se analizaron individualmente a la concentración 1X de 27,7 μM para identificar qué compuestos presentaban la actividad deseada. De estos ensayos, se seleccionaron 73 compuestos y se analizaron para desarrollar curvas de CI₅₀. A partir de los resultados de la curva de CI₅₀, se seleccionaron 34 compuestos para los ensayos de selectividad contra PI3K α y PI3K β (véase el protocolo del ensayo en el Ejemplo 11). A partir de los ensayos de selectividad, un compuesto comparativo, 3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-S-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (Compuesto D-000), se seleccionó como un compuesto relativamente potente y selectivo. Las búsquedas en catálogos y los ensayos de selectividad de muchos compuestos análogos de los compuestos potentes y/o selectivos dieron como resultado solamente un compuesto que era tanto un análogo activo como selectivo de D-000. Este compuesto se adquirió en Contract Services Corporation (nº de Catálogo 7232154) y difería de D-000 en la sustitución de un grupo fenilo para el grupo 2-clorofenilo de D-000.



Como se ha descrito, el inhibidor de PI 3-quinasa LY294002 (Calbiochem, La Jolla, CA) no tiene una selectividad significativa entre las diferentes isoformas de PI 3-quinasa analizadas. En las condiciones de nuestro ensayo, LY294002 inhibió las tres isoformas de PI 3-quinasa con una CI_{50} de 0,3 a 1 μ M. No obstante, cuando el compuesto D-000 se analizó para las mismas isoformas de PI 3-quinasa, se observó una selectividad diferente. Específicamente, como se muestra en la Figura 1, D-000 inhibió la actividad de la isoforma δ de PI3K con una CI_{50} de unos 0,3 μ M, mientras que en condiciones similares no inhibió las actividades de las isoformas α y β a un límite de 100 μ M de compuesto. Estos resultados demuestran que D-000 inhibe selectivamente la actividad de PI3K δ .

EJEMPLOS 3-7

Dado que PI3K δ se expresa a unos niveles significativos solamente en los leucocitos, es importante estudiar los efectos del inhibidor selectivo de PI3K δ sobre las funciones de los leucocitos. Por consiguiente, se examinaron los efectos de la inhibición de PI3K δ en varios tipos de leucocitos. Se analizaron los neutrófilos para determinar los efectos que la inhibición selectiva de PI3K δ podría provocar (Ejemplo 3, a continuación). Sorprendentemente se averiguó que la inhibición selectiva de la actividad de PI3K δ parece estar significativamente asociada con la inhibición de alguna, pero no de todas las funciones características de los neutrófilos activados. Por otra parte, los efectos de la inhibición de PI3K δ sobre la función de las células B y T, también fueron analizados (Ejemplos 4-5, a continuación). Asimismo, dado que PI3K δ también se expresa en los osteoclastos, se estudió el efecto de la inhibición de PI3K δ sobre la función de estas células especializadas (Ejemplo 6, a continuación).

EJEMPLO 3

Caracterización del papel de PI3K δ en la función de los neutrófilos

Se analizaron los efectos de un inhibidor de PI3K δ de la divulgación, es decir D-000, sobre las funciones de los neutrófilos como la generación de superóxido, la exocitosis de elastasa, la quimiotaxis y la muerte de bacterias.

A. Preparación de neutrófilos de sangre humana

Partes alícuotas (8 ml) de sangre heparinizada de voluntarios sanos se estratificaron sobre tampones de 3 ml de 7,3 % FICOLL® (Sigma, St. Louis, MO) y 15,4 % HYPAQUE® (Sigma) y se centrifugaron a 900 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa (Beckman). La banda rica en neutrófilos inmediatamente superior al tampón FICOLL®-HYPAQUE® se recogió y se lavó con una solución de sal equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía 0,1 % de gelatina. Los eritrocitos residuales se retiraron mediante lisis hipotónica con 0,2 % de NaCl. La preparación de neutrófilos se lavó dos veces con HBSS que contenía 0,1 % de gelatina y se usó de inmediato.

B. Medición de la producción de superóxido por parte de los neutrófilos

La generación de superóxido es una de las características de la activación de los neutrófilos. Diversos activadores potencian la generación de superóxido por parte de los neutrófilos. Se midió el efecto del inhibidor de PI3K δ D-000 sobre la generación de superóxido por parte de tres agonistas diferentes: TNF α , IgG, y fMLP, representando cada una clases separadas del activador. El superóxido generado por los neutrófilos se midió controlando el cambio en la absorbancia tras la reducción del citocromo C mediante la modificación del método descrito por Green et al., (pp. 14.5.1-14.5.11 in Supp. 12, Curr Protocols Immunol (Eds., Colligan et al.) (1994)) del siguiente modo. Los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos se cubrieron durante una noche a 4 °C con 50 μ l de solución de 2 mg/ml de IgG o fibrinógeno humano. Los pocillos se lavaron con PBS y se añadieron los siguientes reactivos a cada pocillo: 50 μ l de HBSS o superóxido dismutasa (1 mg/ml), 50 μ l de HBSS o TNF α (50 ng/ml), 50 μ l de citocromo C (2,7 mg/ml) y 100 μ l de suspensión de neutrófilos humanos purificados (2×10^6 células/ml). La placa se centrifugó durante dos minutos a 200 rpm y la absorbancia a 550 nm se controló durante dos horas. Para medir las cantidades relativas de superóxido generadas, los valores obtenidos de los pocillos que contenían superóxido dismutasa se restaron de todos y se normalizaron con respecto a los valores obtenidos de los pocillos sin ningún inhibidor.

Como se muestra en la Figura 2, el inhibidor de PI3K δ D-000 inhibe la generación de superóxido inducida por TNF de los neutrófilos de una forma dependiente de la concentración. La generación de superóxido inducida por TNF se redujo a su valor máximo medio a aproximadamente 3 μ M D-000. La Figura 2 también revela que la generación de superóxido inducida por IgG no se veía significativamente inhibida por D-000. De hecho, incluso a 10 μ M este inhibidor de PI3K δ no tuvo ningún efecto sobre la generación de superóxido inducida por IgG.

A continuación se estudió el efecto de D-000 sobre la generación de superóxido inducida por otro potente inductor, el péptido bacteriano formilado fMLP. Al igual que la generación de superóxido inducida por TNF, la generación de superóxido inducida por fMLP también se vio inhibida por D-000 (Figura 3). Estos resultados demuestran que el inhibidor de PI3K δ D-000 puede prevenir la inducción específica del estímulo de la generación de superóxido por parte de los neutrófilos, lo que indica que PI3K δ está implicada en este proceso.

C. Medición de la exocitosis de elastasa de los neutrófilos

Además de la generación de superóxido, los neutrófilos activados también responden liberando varias proteasas que son responsables de la destrucción de tejidos y cartílago durante la inflamación. Se midió el efecto de D-000 sobre la exocitosis de elastasa, como un indicativo de la liberación de proteasa. La exocitosis de elastasa se cuantificó mediante la modificación del procedimiento descrito por Ossanna et al. (J Clin Invest, 77:1939-1951 (1986)), como sigue. Los neutrófilos humanos purificados ($0,2 \times 10^6$) (tratados con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO) se estimularon con fMLP en PBS conteniendo 0,01 mg/ml de citocolasina B, 1,0 μ M de azida sódica (NaN_3), 5 μ g/ml de L-metionina y fMLP 1 μ M durante 90 minutos a 37 $^\circ\text{C}$ en una placa de 96 pocillos. Al finalizar el período de incubación, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, y 90 μ l del sobrenadante se transfirieron a 10 μ l de la solución 10 mM de un péptido del sustrato de elastasa, MeO-suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, donde MeO-suc = metoxi-succinilo; pNA = p-nitroanilida (Calbiochem, San Diego, CA). La absorbancia a 410 nm se controló durante dos horas en un lector de placas de 96 pocillos. Para medir las cantidades relativas de elastasa excitada, todos los valores de absorbancia se normalizaron con respecto a los valores sin ningún inhibidor. Como se muestra en la Figura 4, el inhibidor de PI3K δ D-000 inhibe notablemente la exocitosis de elastasa inducida por fMLP y lo hace de una forma dependiente de la dosis. La inhibición alcanzó la máxima media a una concentración de aproximadamente 2-3 de μ M D-000.

D. Medición de la migración de neutrófilos humanos inducida por fMLP

Los neutrófilos tienen la capacidad intrínseca de migrar a través de los tejidos y son uno de los primeros tipos de células en llegar a los lugares de la inflamación o lesión tisular. Se midió el efecto de D-000 sobre la migración de los neutrófilos hacia un gradiente de concentración de gMLP. El día antes se realizaron los ensayos de migración: se cubrieron placas de seis pocillos con una proteína de fusión ICAM-1/Fc recombinante (Van der Vieren et al., Immunity, 3:683-690 (1995)) (25 μ g/ml en tampón de bicarbonato, pH 9,3) y se dejaron una noche a 4 $^\circ\text{C}$. Después del lavado, se añadió una solución de agarosa al 1 % en RPMI-1640 con albúmina sérica bovina 0,5 % (BSA) a los pocillos con o sin un inhibidor y se introdujeron las placas en un frigorífico antes de realizar los agujeros en la agarosa gelificada para generar la proliferación (un agujero central rodeado de seis periféricos por pocillo).

Los neutrófilos humanos se obtuvieron como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 0,5 % de BSA a 5×10^6 células/ml. Después de combinar volúmenes iguales del medio y la suspensión de neutrófilos (sea con DMSO o con una dilución en serie del compuesto de ensayo en DMSO), los neutrófilos se alicotaron en los agujeros periféricos, mientras que el agujero central recibió fMLP (5 μ M). Las placas se incubaron a 37 $^\circ\text{C}$ en presencia de 5 % de CO_2 durante cuatro horas, seguida de la terminación de la migración mediante la adición de una solución de glutaraldehído al 1 % en D-PBS. Después de retirar la capa de agarosa, los pocillos se lavaron con agua destilada y se secaron.

El análisis de la migración de neutrófilos se realizó en una estación de trabajo de vídeo con microscopio invertido DIAPHOT® (objetivo de 1x) utilizando el programa NIH 1,61. Utilizando los programas Microsoft Excel y la curva de la tabla 4 (SSPS Inc., Chicago IL), se obtuvo un índice de migración para cada una de las condiciones estudiadas. El índice de migración se definió como la superficie bajo una curva que representa el número de neutrófilos migrados frente a la distancia neta de migración por célula.

Como se muestra en la Figura 5, el inhibidor de PI3K δ D-000 tuvo un profundo efecto sobre la migración de neutrófilos, inhibiendo esta actividad de una forma dependiente de la dosis. La CE_{50} de este compuesto para la inhibición de la migración de neutrófilos en este ensayo es aproximadamente de 1 μ M. Basándose en una inspección visual de las trayectorias registradas de las células de este ensayo, parece que la longitud de la trayectoria total de los neutrófilos no se vio significativamente afectada por el compuesto de prueba. Sin embargo, el compuesto afectó a la dirección o la orientación de los neutrófilos, de forma que en lugar de migrar a lo largo del eje del gradiente quimioatrayente las células migraron de forma no dirigida o menos dirigida.

E. Medición de la capacidad bactericida de los neutrófilos

Dado que el inhibidor de PI3K δ D-000 afecta a ciertas funciones de neutrófilos anteriormente detalladas, resultaba interesante comprobar si el compuesto afecta a la eliminación de bacterias mediada por neutrófilos. El efecto de D-000

sobre la eliminación de *Staphylococcus aureus* mediada por neutrófilos se estudió conforme al método descrito por Clark y Nauseef (pp. 7.23.4-7.23.6 in Vol. 2, Supp. 6, Curr Protocols Immunol (Eds., Colligan et al.) (1994)). Los neutrófilos humanos purificados (5×10^6 células/ml) (tratadas con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO) se mezclaron con suero autólogo. Las células *S. aureus* generadas durante la noche se lavaron, se resuspendieron en HBSS y se añadieron neutrófilos opsonizados en suero en una proporción de 10:1. Se dejó que los neutrófilos internalizaran la bacteria mediante fagocitosis por incubación a 37 °C durante 20 minutos. Las bacterias no internalizadas se eliminaron mediante 10 unidades/ml de lisostafina a 37 °C durante 5 minutos y la mezcla total se pasó a 37 °C. Se extrajeron muestras en varios momentos hasta 90 minutos y los neutrófilos se lisaron mediante dilución en agua. Las bacterias viables se contaron con diluciones apropiadas en una placa de tripticasa-soja-agar y se contaron las colonias de *S. aureus* tras dejarlas crecer durante una noche.

Como se muestra en la Figura 6, la eliminación de *S. aureus* mediada por neutrófilos fue similar en las muestras tratadas con DMSO (control) y con D-000. Estos resultados indican que el inhibidor de PI3K δ no afecta significativamente a la capacidad de los neutrófilos para eliminar *S. aureus*, lo que sugiere que PI3K δ no está implicada en esta trayectoria de la función de los neutrófilos.

EJEMPLO 4

Caracterización del papel de PI3K δ en la función de los linfocitos B

También se estudiaron los efectos del inhibidor de PI3-quinasa sobre las funciones de las células B, incluyendo los índices clásicos como la producción de anticuerpos y la proliferación inducida por un estímulo específico.

A. Preparación y estimulación de células B de la sangre humana periférica

Se mezcló sangre heparinizada (200 ml) de voluntarios sanos con un volumen igual de D-PBS, se estratificó sobre 10 x 10 ml de FICOLL-PAQUE® (Pharmacia), y se centrifugó a 1.600 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se recogieron de la combinación FICOLL®/suero, se cubrieron con 10 ml de suero bovino fetal (FBS) y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Después del lavado, las células se incubaron con DYNAL® Antibody Mix (B cell kit) (Dynal Corp., Lake Success, NY) durante 20 minutos a 4-8 °C. Tras retirar el anticuerpo no unido, se mezcló PBL con perlas magnéticas recubiertas contra IgG de ratón (Dynal) durante 20 minutos a 4-8 °C, agitando suavemente para después eliminar las células no B marcadas en el separador de perlas magnéticas. Este procedimiento se repitió una vez más. Las células B se resuspendieron en RPMI-1640 con 10 % de FBS, y se mantuvieron en hielo hasta su utilización.

B. Medición de la producción de anticuerpos de las células B humanas

Para estudiar la producción de anticuerpos, las células B se alicuotaron a 50-75 x 10³ células/pocillo en una placa de 96 pocillos con o sin inhibidor, a las que se añadió IL-2 (100 U/ml) y células de *Staphylococcus aureus* (1:90.000) PANSORBIN® (Calbiochem). Parte del medio se retiró después de 24-36 horas y se añadió un medio nuevo (con o sin inhibidor) e IL-2. Los cultivos se incubaron a 37 °C, en presencia de un incubador de CO₂ durante otros siete días. Se tomaron muestras de cada condición (por triplicado) y se analizaron para comprobar los valores de IgG e IgM, con un ELISA. Dicho brevemente, se recubrieron cuatro placas de 96 pocillos IMMULON® (50 μ l/pocillo) con 150 ng/ml de IgG antihumana de burro (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA), o 2 μ g/ml de IgG+IgM antihumana de burro (H+L) (Jackson ImmunoResearch) en tampón de bicarbonato, y se dejaron una noche a 4 °C. Después de un triple lavado con una solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,1 % de TWEEN®-80 (PBST) (350 μ l/pocillo) y del bloqueo con suero de cabra al 3 % en PBST (100 μ l/pocillo) durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron muestras (100 μ l/pocillo) del sobrenadante de células B diluidas en PBST. Para las placas de IgG el intervalo de dilución fue de 1:500 a 1:10000, y para IgM de 1:50 a 1:1000. Después de una hora, las placas se expusieron a IgG antihumana conjugada con biotina (100 ng/ml) o IgM antihumana (200 ng/ml) (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos, seguido de estreptavidina-HRP (1:20000) durante 30 minutos y, finalmente, a una solución de TMB (1:100) con H₂O₂ (1:10000) durante 5 minutos, con tres lavados en PBST entre estos pasos. El desarrollo del color se frenó con una solución de H₂SO₄ y las placas fueron leídas en un lector de placas ELISA.

Como se muestra en la Figura 7, D-000 inhibió significativamente la producción de anticuerpos. La producción de IgM se vio afectada en mayor medida que la producción de IgG: la inhibición de la producción de IgM máxima media se observó aproximadamente a 1 μ M, frente a 7 μ M para la inhibición comparable de la producción de IgG.

C. Medición de la proliferación de células B en respuesta a la estimulación de IgM en la superficie de la célula

En el experimento anterior, las células B se estimularon utilizando PANSORBIN®. También se midió el efecto de D-000 sobre la respuesta de proliferación de células B cuando se estimulaba a través de la IgM de su superficie celular utilizando un anticuerpo anti-IgM. Los esplenocitos murinos (Balb/c) se colocaron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 2 x 10⁵ células por pocillo en 10 % de FBS/RPMI. Se añadieron las diluciones apropiadas del inhibidor de prueba en el medio completo a las células y se incubaron las placas durante 30-60 minutos antes de la adición del estímulo. Tras la preincubación con el inhibidor de prueba, se añadió una preparación F (ab¹)₂ de anticuerpo de cabra

específico para la cadena p de IgG de ratón a los pocillos, a una concentración final de 25 µg/ml. Las placas se incubaron a 37 °C durante 3 días y se añadió 1 µCi de [³H]-timidina a cada pocillo durante las cuatro últimas horas de cultivo. Las placas se recogieron sobre filtros de fibra, se lavaron y la incorporación del radiomarcador se determinó utilizando un contador beta (Matrix 96, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) y se expresó como recuentos por minuto (CPM).

La Figura 8 muestra el efecto de D-000 sobre la proliferación de células B estimulada con anti-IgM. El compuesto inhibió la proliferación de células B estimulada con anti-IgM de forma dependiente de la dosis. Aproximadamente a 1 µM, la proliferación se redujo hasta su valor máximo medio.

Dado que el compuesto D-000 inhibe la proliferación de células B, se prevé que este compuesto y otros inhibidores de PI3Kδ se puedan utilizar para suprimir una proliferación células B en situaciones clínicas. Por ejemplo, en la neoplasia maligna de células B, las células B de diversas fases de diferenciación muestran una regulación alterada de su proliferación. Basándose en los resultados mostrados anteriormente, se puede deducir que los inhibidores selectivos de PI3Kδ se podrían emplear para controlar, limitar o inhibir el crecimiento de dichas células.

EJEMPLO 5

Caracterización del papel de PI3Kδ en la función de los linfocitos T

Se midió la proliferación de células T en respuesta a la coestimulación de CD3+CD28. Las células T se purificaron en sangre humana sana mediante selección negativa utilizando perlas magnéticas revestidas de anticuerpos, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dyna) y se resuspendieron en RPMI. Las células se trataron con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO y se colocaron a 1 x 10⁵ células/pocillo en una placa de 96 pocillos precubiertos con IgG de cabra antiratón. A continuación, a cada pocillo se añadieron anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD3 y anti-CD28 a 0,2 ng/ml y 0,2 µg/ml, respectivamente. La placa se incubó a 37 °C durante 24 horas y se añadió [³H]-timidina (1 µCi/pocillo). Después de otras 18 horas de incubación, se recogieron las células con un recolector de células automático, se lavaron y se cuantificó la radioactividad incorporada.

A pesar de que el inhibidor de PI3Kδ D-000 inhibió la proliferación de células T inducida por anti-CD3 y anti-CD28, su efecto no es tan fuerte como su efecto sobre las células B o sobre algunas de las funciones de los neutrófilos. La inhibición máxima media de la incorporación de timidina no se consiguió a la máxima concentración analizada, es decir 10 µM D-000.

EJEMPLO 6

Caracterización del papel de PI3Kδ en la función de los osteoclastos

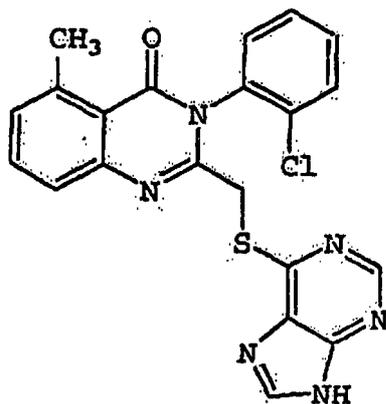
Para analizar el efecto del inhibidor de PI3Kδ D-000 sobre los osteoclastos, se aislaron células de médula ósea de ratón y se diferenciaron en osteoclastos tratando las células con el factor estimulante de colonias de macrófagos¹ (mCSF-¹) y el ligando de osteoprotegerina (OPGL) en un medio con suero (αMEM con 10 % de FBS inactivado por calor; Sigma) durante tres días. El cuarto día se habían desarrollado los osteoclastos, se retiró el medio y se recogieron las células. Los osteoclastos se colocaron sobre láminas de dentina a 10⁵ células/pocillo en un medio de crecimiento, es decir αMEM con 1 % de suero y 2 % de BSA con 55 µg/ml de OPGL y 10 ng/ml de mCSF-1. Después de 3 horas, el medio se cambió por 1 % de suero y 1 % de BSA, con o sin osteopontina (25 µg/ml) y los inhibidores de PI3K (100 nM). El medio se cambió cada 24 horas por osteopontina nueva y los inhibidores. A las 72 horas se retiró el medio y las superficies de dentina se lavaron con agua para retirar los restos celulares, y se tiñó con hematoxilina ácida. El exceso de tinte se lavó y se cuantificaron las profundidades de los agujeros mediante microscopia confocal.

Como se muestra en la Tabla 1, en los dos experimentos, los inhibidores de PI 3-quinasa tuvieron un efecto inhibitor sobre la función del osteoclasto. Los dos inhibidores no específicos, LY294002 y wortmanina, inhibieron la actividad de los osteoclastos. Sin embargo, el inhibidor de PI3Kδ D-000 tuvo un efecto más pronunciado, dado que a 100 nM este compuesto inhibió casi por completo la actividad del osteoclasto.

Tabla 1			
Osteopontina (OPN)	D-000 + OPN	LY294002 + OPN	Wortmannina + OPN
10 ± 0,5	1	4,6 ± 0,22	5,7 ± 0,6
9 ± 0,4	1	5,8 ± 0,5	5 ± 0,5

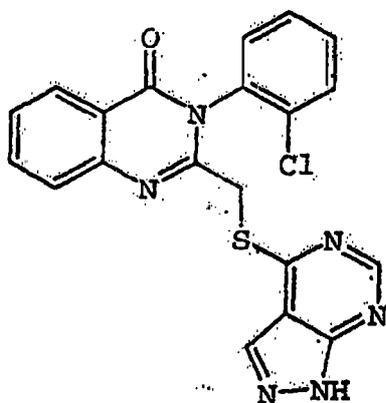
EJEMPLO 7**Caracterización del papel de PI3Kδ en la función de los basófilos**

- 5 La evaluación del efecto de un compuesto de la invención sobre la función basófila se probó utilizando un ensayo convencional de liberación de histamina, en general conforme al método descrito en Miura et al., J Immunol, 162:4198-206 (1999). Explicado brevemente, los basófilos enriquecidos se preincubaron con compuestos de prueba a distintas concentraciones desde 0,1 nM a 1.000 nM, durante 10 minutos a 37 °C. A continuación, se añadió IgE policlonal antihumana de cabra (0,1 µg/ml) o fMLP y se dejó incubando durante otros 30 minutos. La liberación de histamina en el sobrenadante se midió utilizando una técnica fluorométrica automatizada. Se analizaron dos
- 10 compuestos de referencia, que se muestran a continuación.



D-026 (compuesto de referencia)

15



D-999 (compuesto de referencia)

- Se observó una reducción dependiente de la dosis en la liberación de histamina para 3-(2-clorofenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-026) cuando se estimularon los basófilos con anti-IgE. Esta supresión de la liberación de histamina fue básicamente del 100 % a 1.000 nM, con una CE₅₀ cercana a 25 nM. Otro compuesto, 3-(2-clorofenil)-2-(1H-pirazolo[3, 4-d]pirimidin-4ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-999), en el que se reorganiza la estructura del anillo de purina, fue menos eficaz en la inhibición de la liberación de histamina. Ningún compuesto provocó ningún efecto cuando los basófilos se estimularon con fMLP. Por comparación, el inhibidor de PI3K no selectivo LY294002 se analizó a 0,1 nM y 10.000 nM, registrando una inhibición cercana al 100 % de la liberación de histamina a la concentración más alta.
- 20
- 25

- Estos datos indican que los inhibidores de la actividad de PI 3-quinasa delta se pueden utilizar para suprimir la liberación de histamina, que es uno de los mediadores de la alergia. Dado que la actividad de las diversas PI 3-quinasas es necesaria para la exocitosis, secreción y el tráfico de proteínas en muchos tipos de células, los datos anteriores sugieren que la liberación de histamina por parte de otras células, como los mastocitos, también puede ser alterada por los inhibidores selectivos de PI 3-quinasa delta.
- 30

Ejemplos de síntesis química

- 35 A continuación se recogen ejemplos no limitantes de compuestos de la invención. Se entiende en la técnica que los grupos de protección se pueden emplear cuando resulta necesario, de conformidad con los principios generales de la

química sintética. Estos grupos de protección son retirados en los últimos pasos de la síntesis en condiciones básicas, ácidas o hidrogenolíticas rápidamente evidentes para las personas entendidas en la técnica. Empleando una manipulación y protección apropiadas de cualesquiera de las funcionalidades químicas, la síntesis de compuestos de la fórmula estructural (I) no específicamente recogida en el presente se puede realizar mediante métodos análogos a los esquemas que se recogen a continuación.

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin otras purificaciones. Todas las reacciones y fracciones de cromatografía fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice de 250 mm, visualizadas con luz ultravioleta (UV) y teñidas con yodo (I₂). Los productos e intermedios fueron purificados mediante cromatografía flash o cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

En los ejemplos sintéticos se utilizan las siguientes abreviaturas: ac. (acuoso), H₂O (agua), CHCl₃ (cloroformo), HCl (ácido hidrocórico), MeOH (metanol), NaOH (hidróxido de sodio), NaOMe (metóxido de sodio), TFA (ácido trifluoroacético), K₂CO₃ (carbonato de potasio), SOCl₂ (cloruro de tionilo), CH₂Cl₂ (cloruro de metileno), EtOAc (acetato etílico), DMF (dimetilformamida), EtOH (etanol), DMSO (dimetil sulfóxido), NaHCO₃ (bicarbonato sódico), TLC (cromatografía en capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), HOBT (hidroxibenzotriazol), EDC (etil dietilaminopropilcarbodiimida), DIEA (diisopropil etilamina), y HOAc (ácido acético).

I. Procedimientos generales

Procedimiento A

Se añadió cloruro de trionilo a una solución agitada rápidamente de ácido antranílico o ácido benzoico en benceno, y la mezcla se agitó a reflujo durante 5 a 18 horas. La reacción se concentró al vacío, y se lavó dos veces con benceno. El aceite resultante se disolvió en CHCl₃ y a esa solución se añadió la anilina correspondiente. La mezcla de la reacción se calentó a reflujo y se agitó hasta que el TLC determinó su conclusión, momento en el que la mezcla de la reacción se enfrió hasta alcanzar la temperatura ambiente. El precipitado se filtró y el resultado se concentró al vacío. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía y/o se recrystalizó con MeOH para proporcionar amidas 1a-1r.

Procedimiento B

A una suspensión agitada rápidamente de una amida en ácido acético glacial se añadió cloruro de cloroacetilo. La mezcla de la reacción se calentó a 120 °C y se agitó a esa temperatura hasta que la TLC determinó que se había completado. Tras enfriarse brevemente, la mezcla de la reacción se concentró *al vacío*. El residuo en bruto se purificó mediante extracción, cromatografía y/o recrystalización para proporcionar cloruros 2a-2r.

Procedimiento C

Una mezcla de un cloruro, sea de nitrógeno o de un nucleófilo de azufre, por ejemplo, monohidrato de mercaptopurina o adenina, y K₂CO₃ en DMF se agitó a temperatura ambiente durante 15-72 horas. La suspensión resultante se vertió en agua y se mantuvo a 4 °C durante varias horas. El sólido en bruto se filtró, se lavó con agua y se purificó mediante cromatografía o recrystalización para proporcionar los productos finales:

EJEMPLO 8

Preparación de los compuestos intermedios: amidas

2-amino-N-(2-clorofenilo)-4,5-dimetoxibenzamida (1a)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 4,5-dimetoxiantranílico (5,0 g, 25,4 mmol) y SOCl₂ (5,5 ml, 76,1 mmol) en benceno (100 ml), seguido de 2-cloroanilina (6,7 ml, 63,5 mmol) y CHCl₃ (75 ml). El producto se lavó con NaHCO₃ (2 x 25 ml) acuoso y HCl (0,5 M, 75 ml) y se purificó mediante cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 4,3 g de una espuma marrón (55 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,42 (dd, J=1,5, 8,3 Hz, 1H); 8-32 (s a, 1H); 7,40 (dd, J=1,4, 8,0 Hz, 1H); 7,31 (dt, J=1,4, 7,9 Hz, 1H); 7,05 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 7,03 (s, 1H); 6,24 (s, 1H); 3,88 (s, 3H); 3,87 (s, 3H), EM (ES) : m/z 307,0 (M⁺).

2-amino-5-bromo-N-(2-clorofenil) benzamida (1b)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-5-bromobenzoico (5,0 g, 23,1 mmol) y SOCl₂ (7,0 mL, 95,9 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (7,3 ml, 69,3 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto fue purificado mediante dos cromatografías en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,48 g de un sólido naranja amarillento (20 %) RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,36 (dd, J=1,2, 8,2 Hz, 1H); 8,20 (s a, 1H); 7,62 (d, J=2,1 Hz, 1H); 7,42 (dd, J=1-3, 8,0 Hz, 1H); 7,34 (dd, J=2,2, 8,8 Hz, 1H); 7,28-7,33 (m, 1H); 7,09 (dt, J=1,4, 7,7 Hz, 1H); 6,62 (d, J=8,7 Hz, 1H); 5,57 (sa, 2H).

2-amino-N-(2-clorofenil)-4-fluorobenzamida (1c)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-4-fluorobenzoico (1,15 g, 7,41 mmol) y SOCl₂ (1,4 mL, 18,5 mmol) en benceno (25 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,6 ml, 14,8 mmol) y CHCl₃ (25 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ y, a continuación, se trituró en hexanos para proporcionar 1,02 g de un sólido blanquecino (52 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 12,91 (s a, 1H); 8,72 (dd, J=2,7, 12 Hz, 1H); 8,34 (dd, J=6,4, 9,2 Hz, 1H); 8,29 (dd, J=5,9, 8,8 Hz, 1H); 7,81 (dd, J=6,2, 8,8 Hz, 1H); 7,28 (dt, J=2-4, 8,4 Hz, 1H); 7,21 (dd, J=2-4, 9,0 Hz, 1H); 6,92 (ddd, J=2-4, 7,3, 9,1 Hz, 1H); 6,54 (ddd, J=2-4, 7,8, 8,8 Hz, 1 H); 6,45 (dd, J=2-4, 11 Hz, 1 H); 5,93 (s a, 2H). EM (ES): m/z 265,0 (M+).

2-amino-5-cloro-N-(2-clorofenil) benzamida (1d)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-5-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl₂ (2,2 mL, 29,2 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,5 ml, 23,3 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto se purificó mediante recristalización en MeOH para proporcionar 1,72 g de un sólido amarillo oscuro (52 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,37 (dd, J=1,5, 8,3 Hz, 1H) ; 8,22 (s a, 1H); 7,48 (d, J=2,3 Hz, 1H); 7,42 (dd, J=1,5, 8,1 Hz, 1H); 7,31 (dt, J=1,4, 7,8 Hz, 1H); 7,22 (dd, J=2-4, 8,8 Hz, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 6,67 (d, J=8,8 Hz, 1H); 5,56 (s a, 2H).

2-amino-N-(2-clorofenil)-6-fluorobenzamida (1e)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-fluorobenzoico (2,0 g, 12,9 mmol) y SOCl₂ (2,3 ml, 32,2 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,5 ml, 25,8 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto se purificó mediante cromatografía en EtOAc/hexanos para proporcionar 2,06 g de un sólido naranja claro (60 %) RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 9,00 (d, J= 17Hz, 1H); 8,47 (d, J=8,3Hz, 1H); 7,41 (d, J= 8,0 Hz, 1H) ; 7,30 (t, J=7,9 Hz, 1H); 7,10-7,20 (m, 1H); 7,07 (t, J=7,7 Hz, 1H); 6,49 (d, J=8,3 Hz, 1H); 6,03 (s a, 2H). EM (ES): m/z 265,0 (M+).

2-amino-6-cloro-N-(2-clorofenil) benzamida (1f)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,5 g, 14,6 mmol) y SOCl₂ (2,7 ml, 36,4 mmol) en benceno (75 ml), seguido de 2-cloroanilina (3,1 ml, 29,1 mmol) y CHCl₃ (75 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,05 g de un sólido naranja amarillento (26 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,54 (d, J=8,1 Hz, 1H) ; 8,30 (s a, 1H); 7,41 (dd, J=1,5, 8,0 Hz, 1H); 7,33 (t, J=7,8 Hz, 1H); 7,10 (t, J=8,1 Hz, 1H); 7,09 (dt, J=1-6, 7,8 Hz, 1H); 6,78 (dd, J=0,4, 7,9 Hz, 1H); 6,63 (dd, J=0,9, 8,2 Hz, 1H); 4,69 (s a, 2H). EM (ES): m/z 303,0 (M+22), 281,0 (M+).

2-amino-N-(2-clorofenilo)-6-metilbenzamida (1 g)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-metilbenzoico (2,5 g, 16,5 mmol) y SOCl₂ (3,0 ml, 41,3 mmol) en benceno (75 ml), seguido de 2-cloroanilina (3,5 ml, 33,0 mmol) y CHCl₃ (75 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,19 g de un aceite marrón (51 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,58 (d, J=8,1 Hz, 1H); 7,99 (s a, 1H); 7,40 (dd, J=1,4, 8,0 Hz, 1H); 7,34 (t, J=7,7 Hz, 1H); 7,11 (t, J=7,8 Hz, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 6,64 (d, J=7,5 Hz, 1H); 6,59 (d, J=8,1 Hz, 1H); 4,29 (s a, 2H) ; 2-45 (s, 3H). EM (ES): m/z 283,0 (M+22).

2-amino-3-cloro-N-(2-clorofenil) benzamida (1h)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-3-clorobenzoico (1,0 g, 5,82 mmol) y SOCl₂ (1,1 ml, 14,6 mmol) en benceno (25 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,2 ml, 11,7 mmol) y CHCl₃ (25 ml). El producto se recristalizó en MeOH para proporcionar 1,29 g de un sólido amarillo (78 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,43 (dd, J=1,4, 8,3 Hz, 1H); 8,30 (s a, 1H); 7,47 (dd, J=1,1, 8,0 Hz, 1H) ; 7,42 (d, J=8,0 Hz, 2H); 7,33 (dt, J=1,4, 7,9 Hz, 1H); 7,09 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 6,68 (t, J=7,9 Hz, 1H); 6,13 (s a, 2H). EM (ES): m/z 281,0 (M+).

2-amino-N-bifenil-2-il-6-clorobenzamida (1i)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl₂ (2,1 ml, 29,3 mmol) en benceno (60 ml), seguido de 2-aminobifenilamina (4,15 ml, 24,5 mmol) y CHCl₃ (60 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,16 g de un residuo ámbar oscuro espumoso (57 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,48 (d, J=8,2 Hz, 1H); 7,79 (s a, 1H); 7,34-7,46 (m, 6H); 7,20-7,30 (m, 2H); 7,00 (t, J=8,1 Hz, 1H); 6,63 (dd, J=0,6, 7,9 Hz, 1H); 6,54 (d, J=8,3 Hz, 1H); 4,58 (s a, 2H). EM (ES): m/z 323,1 (M+).

2-amino-6-cloro-N-o-tolilbenzamida (1j)

Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (1,0 g, 5,83 mmol) y SOCl₂ (1,1 ml, 14,6 mmol) en benceno (30 ml), seguido de o-toluidina (1,2 ml, 12,8 mmol) y CHCl₃ (30 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 840 mg de un sólido amarillo oleaginoso (55 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,96 (d, J=7,9 Hz, 1H); 7,60 (s a, 1H); 7,23-7,30 (m, 2H); 7,14 (t, J=7,5 Hz, 1H); 7,11 (t, J=8,3 Hz, 1H); 6,78 (d, J=7,9

H_z, 1H); 6,64 (d, J=8,2 Hz, 1H); 4,73 (s a, 2H); 2,35 (s, 3H). EM (ES): m/z 261,0 (M⁺).

2-amino-6-cloro-N-(2-fluorofenil)benzamida (1k)

5 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl₂ (2,1 mL, 29,1 mmol) en benceno (60 ml), seguido de 2-fluoroanilina (2,5 ml, 23,4 mmol) y CHCl₃ (60 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,05 g de un sólido amarillo (34 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,45 (t, J=8,0 Hz, 1H); 8,01 (s a, 1H); 7,02-7,22 (m, 4H); 6,78 (dd, J=0,5, 7,9 Hz, 1H); 6,64 (dd, J=0,8, 8,2 Hz, 1H); 4,73 (s a, 2H). EM (ES): m/z 265,0 (M⁺).

10

2-amino-6-cloro-N-(2-metoxifenil)benzamida (1l)

15 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl₂ (2,1 mL, 29,1 mmol) en benceno (60 ml), seguido de o-anisidina (2,6 ml, 23,4 mmol) y CHCl₃ (60 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,61 g de un aceite amarillo oscuro (81 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,53 (dd, J=1,7, 7,9 Hz, 1H); 8,39 (s a, 1H); 7,11 (dt, J=1-6, 7,8 Hz, 1H); 7,09 (t, J=8,1 Hz, 1H); 7,02 (dt, J=1,4, 7,8 Hz, 1H); 6,92 (dd, J=1,4, 8,0 Hz, 1H); 6,62 (dd, J=0,9, 8,2 Hz, 1H); 4,66 (s a, 2H); 3-87 (s, 3H). EM (ES): m/z 277,0 (M⁺).

2-amino-N-(2-clorofenil)-3-trifluorometilbenzamida (1m)

20 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 3-trifluorometilantranílico (2,0 g, 9,75 mmol) y SOCl₂ (1,8 ml, 24,4 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,1 ml, 19,5 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto se purificó mediante recristalización en MeOH para proporcionar 2,38 g de cristales amarillos (78 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,40 (dd, J=1,4, 8,3 Hz, 1H); 8,25 (s a, 1H); 7,71 (d, J=7,8 Hz, 1H); 7,60 (d, J=7,8 Hz, 1H); 7,43 (dd, J=1,4, 8,0 Hz, 1H); 7,34 (dt, J=1-3, 7,9 Hz, 1H); 7,11 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 6,77 (t, J=7,8 Hz, 1H); 6,24 (s a, 2H). EM (ES): m/z 315,0 (M⁺).

25

(2-clorofenil) amida de ácido 3-aminonaftaleno-2-carboxílico (1n)

30 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 3-amino-2-naftoico (2,0 g, 10,7 mmol) y SOCl₂ (1,9 mL, 26,7 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,3 ml, 21,4 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto se recristalizó en MeOH para proporcionar 1,71 g de un sólido marrón (54 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 10,88 (s a, 1H); 9,21 (s, 1H); 8,91 (s, 1H); 8,70 (dd, J=1,0, 8,3 Hz, 1H); 7,95-8,01 (m, 1H); 7,87-7,94 (m, 1H); 7,60-7,68 (m, 2H); 7,41 (dd, J=1-3, 8,0 Hz, 1H); 7,34 (dt, J=1,2, 7,8 Hz, 1H); 7,07 (dt, J=1,4, 7,7 Hz, 1H). EM (ES): m/z 297,1 (M⁺).

2-amino-N-(2-clorofenil)-4-nitrobenzamida (1o)

35 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 4-nitroantranílico (5,0 g, 27,5 mmol) y SOCl₂ (5,0 ml, 68,6 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (5,8 ml, 55,0 mmol) y CHCl₃ (150 ml). El producto se purificó mediante cromatografía en CH₂Cl₂ seguido de recristalización en MeOH para proporcionar 2,20 g de un sólido marrón anaranjado (31 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,41 (dd, J=18,5, 8,3 Hz, 1H); 8,31 (s a, 1H); 7,67 (d, J=7,8 Hz, 1H); 7,57 (d, J=7,8 Hz, 1H); 7,52 (dd, J=1,4, 8,0 Hz, 1H); 7,44 (dt, J=1-3, 7,9 Hz, 1H); 7,11 (dt, J=1,5, -3 Hz, 1H); 7,13 (t, J=7,8 Hz, 1H); 5,88 (s a, 2H). EM (ES): m/z 292,0 (M⁺).

40

2-amino-N-(2-clorofenil)-4,5-hidroxibenzamida (1p)

45 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico (5,0 g, 32,7 mmol) y SOCl₂ (6,0 ml, 81,6 mmol) en benceno (150 ml), seguido de 2-cloroanilina (6,9 ml, 65,4 mmol) y CHCl₃ (150 ml). El producto se purificó mediante dos cromatografías en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 990 mg de un sólido marrón (12 %) RMN de ¹H (MeOH-d₄) δ: 7,92 (dd, J=1-6, 8,1 Hz, 1H); 7,48 (dd, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 7,34 (dt, J=1,5, 7,7 Hz, 1H); 7,20 (dt, J=1,7, 7,7 Hz, 1H); 7,16 (d, J=2,7 Hz, 1H); 6,83 (dd, J=2,7, 8,7 Hz, 1H); 6,76 (d, J=8,7 Hz, 1H); [6,24 (s a, 2H)]. EM (ES): m/z 263,0 (M⁺).

50

2-amino-N-(2-clorofenil)-4,5-difluorobenzamida (1q)

55 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 4,5-difluoroantranílico (2,0 g, 11,6 mmol) y SOCl₂ (2,1 ml, 28,9 mmol) en benceno (60 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,4 ml, 23,2 mmol) y CHCl₃ (60 ml). El producto se purificó mediante dos cromatografías en CH₂Cl₂ y EtOAc/hexanos para proporcionar 769 mg de un sólido amarillo (23 %) RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,69-8,82 (m, 1H); 8,00 (dd, J=8,4, 9,0 Hz, 1H); 7,90 (dd, J=8,9, 12 Hz, 1H); 7,39 (dd, J=6,8, 10 Hz, 1H); 6,53 (dd, J=6,6, 12 Hz, 1H); 6,41 (s a, 2H); 5,79 (s a, 1H). EM (ES): m/z 283,1 (M⁺).

60

2-amino-N-(2-clorofenil)-5-fluorobenzamida (1r)

65 Preparado conforme al Procedimiento A utilizando ácido 2-amino-5-fluorobenzoico (1,0 g, 6,45 mmol) y SOCl₂ (1,2 ml, 16,1 mmol) en benceno (30 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,4 ml, 12,9 mmol) y CHCl₃ (30 ml). El producto se trituró en CH₃Cl₂ para proporcionar 985 mg de un sólido amarillo mostaza (58 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,66 (dd, J=2,9, 8,7 Hz,

1 H); 7,52-7,55 (m, 1 H); 7,32-7,37 (m, 3H); 7,09 (dt, J=3,0, 8,5 Hz, 1 H); 6,71 (dd, J=4,3, 8,7 Hz, 1H). EM (ES): m/z 305,0 (M+40).

EJEMPLO 9

5

Preparación de los compuestos intermedios: Cloruros

2-clorometilo-3-(2-clorofenil)-6, 7-dimetoxi-3H-quinazolin-4-ona (2a)

10 Preparado conforme al Procedimiento B con 1a (2,95 g, 9,63 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,3 ml, 28,9 mmol) en ácido acético (30 ml). Se purificó mediante la extracción en K₂CO₃ acuoso y recristalización con isopropanol para proporcionar 1,61 g de un sólido cristalino marrón (46 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,59-7,66 (m, 2H); 7,45-7,56 (m, 3H); 7,20 (s, 1 H); 4,37 (d, J=12 Hz, 1 H), 4,08 (d, J=12 Hz, 1 H); 4,04 (s, 3H); 4,00 (s, 3H). EM (ES): m/z 365,0 (M+).

6-bromo-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2b)

15 Preparado conforme al Procedimiento B con 1b (500 mg, 1,54 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,37 ml, 4,61 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante recristalización en isopropanol para proporcionar 490 mg de un sólido blanquecino (83 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,43 (d, J=2,3 Hz, 1H); 7,91 (dd, J=2,3, 8,7 Hz, 1H); 7,67 (d, J=8,7 Hz, 1H); 7,60-7,65 (m, 1 H); 7,47-7,56 (m, 2H); 7,52 (t, J=5,3 Hz, 1H); 7,47-7,56 (m, 1H); 4,37 (d, J=12 Hz, 1H), 4,06 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 385,0 (M+).

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-7-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (2c)

25 Preparado conforme al Procedimiento B con 1c (500 mg, 1,89 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,45 ml, 5,67 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante extracción en K₂CO₃ acuoso seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 501 mg de un sólido cristalino amarillo (82 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,32 (dd, J=6,0, 8,9 Hz, 1H); 7,59-7,66 (m, 1H); 7,50-7,55 (m, 3H); 7,44 (dd, J=2-4, 9,4 Hz, 1H); 7,27 (dt, J=2,5, 8,5 Hz, 1H); 4,37 (d, J=12 Hz, 1H), 4,07 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 323,0 (M+).

30

6-cloro-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2d)

35 Preparado conforme al Procedimiento B con 1d (500 mg, 1,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,42 ml, 5,33 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante recristalización en isopropanol para proporcionar 555 mg de un sólido amarillo (92 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,27 (d, J=1,9 Hz, 1H); 7,74-7,78 (m, 2H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,48-7,57 (m, 3H); 4,37 (d, J=12 Hz, 1H), 4,07 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 339,0 (M+).

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-5-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (2e)

40 Preparado conforme al Procedimiento B con 1e (500 mg, 1,89 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,45 ml, 5,67 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante la extracción en K₂CO₃ acuoso y recristalización con isopropanol para proporcionar 430 mg g de un sólido cristalino blanquecino (70 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,76 (dt, J=5,3, 8,2 Hz, 1H); 7,56-7,65 (m, 2H); 7,47-7,56 (m, 3H); 7,16-7,25 (m, 1H); 4,35 (d, J=12 Hz, 1H), 4,07 (d, J=12 Hz, 1H), EM (ES): m/z 323,0 (M+).

45

5-cloro-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2f)

50 Preparado conforme al Procedimiento B con 1f (1,00 g, 3,56 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,85 ml, 10,7 mmol) en ácido acético (15 ml). Se purificó mediante recristalización en isopropanol para proporcionar 791 mg de un sólido cristalino blanquecino (65 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,70 (s, 1H); 7,68 (d, J=3-8 Hz, 1H); 7,61-7,65 (m, 1H); 7,55 (dd, J=2,7, 6,4 Hz, 1H); 7,51 (d, J=3,1 Hz, 1H); 7,50 (s, 2H); 4,35 (d, J=12 Hz, 1H), 4,05 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 339,0 (M+).

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (2g)

55 Preparado conforme al Procedimiento B con 1g (2,18 g, 8,36 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,0 ml, 25,1 mmol) en ácido acético (40 ml). Purificado mediante dos cromatografías en CH₂Cl₂ y EtOAc/hexanos, seguidas de recristalización con isopropanol para proporcionar 638 mg de un sólido cristalino blanquecino (24 %). RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ: 7,73-7,80 (m, 3H); 7,58-7,64 (m, 3H); 7,41 (d, J=7,4 Hz, 1H); 4,40 (d, J=12 Hz, 1H), 4,26 (d, J=12 Hz, 1H); 2,74 (s, 3H). EM (ES): m/z 319,0 (M+).

60

8-cloro-2-clorometil-3-(2'-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2h)

65 Preparado conforme al Procedimiento B con 1h (500 mg, 1,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,49 ml, 6,13 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante extracción en K₂CO₃ acuoso seguido de recristalización en isopropanol

para proporcionar 448 mg de un sólido amarillo (74 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,23 (dd, $J=1,4$, 8,0 Hz, 1H); 7,90 (dd, $J=1,4$, 7,8 Hz, 1H); 7,61-7,66 (m, 1H); 7,51-7,55 (m, 3H); 7,47 (t, $J=8,0$ Hz, 1H); 4,48 (d, $J=12$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J=12$ Hz, 1H). EM (ES): m/z 339,0 (M^+).

5 **3-bifenil-2-il-5-cloro-2-clorometil-3H-quinazolin-4-ona (2i)**

Preparado conforme al Procedimiento B con 1i (2,95 g, 6,20 mmol) y cloruro de cloroacetilo (1,5 ml, 18,6 mmol) en ácido acético (30 ml). Se purificó cromatografía en CH_2Cl_2 , seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 1,44 g de un sólido blanquecino (61 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,61-7,64 (m, 1 H); 7,58-7,59 (m, 1 H); 7,54-7,57 (m, 2H); 7,52-7,53 (m, 1H); 7,45-7,52 (m, 2H); 7,24 (s, 5H); 3,92-4,03 (m, 2H), EM (ES): m/z 381,0 (M^+).

10 **5-cloro-2-clorometil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (2j)**

Preparado conforme al Procedimiento B con 1j (750 mg, 2,88 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,69 ml, 8,63 mmol) en ácido acético (15 ml). Se purificó cromatografía en CH_2Cl_2 , seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 340 mg de un sólido blanco (37 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,69 (d, $J=2,1$ Hz, 1H); 7,68 (q, $J=7,4$ Hz, 1H); 7,54 (dd, $J=2,2$, 7,0 Hz, 1H); 7,35-7,47 (m, 3H); 7,21-7,25 (m, 1H); 4,27 (d, $J=12$ Hz, 1H); 4,11 (d, $J=12$ Hz, 1H); 2,18 (s, 3H). EM (ES): m/z 319,0 (M^+).

20 **5-cloro-2-clorometil-3-(2-fluorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2k)**

Preparado conforme al Procedimiento B con 1k g (1,0 g, 3,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,90 ml, 11,3 mmol) en ácido acético (20 ml). Se purificó mediante cromatografía en CH_2Cl_2 para proporcionar 484 mg de un sólido rosa claro (40 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,69 (s, 1H); 7,68 (d, $J=3,2$ Hz, 1H); 7,56 (d, $J=3,0$ Hz, 1H); 7,54 (d, $J=3,0$ Hz, 1H); 7,40-7,47 (m, 1H); 7,35-7,38 (m, 1H); 7,27-7,32 (m, 1H); 4,35 (d, $J=12$ Hz, 1H); 4,18 (d, $J=12$ Hz, 1H). EM (ES): m/z 323,0 (M^+).

25 **5-cloro-2-clorometil-3-(2-metoxifenil)-3H-quinazolin-4-ona (2l)**

Preparado conforme al Procedimiento B con -6 g (2,6 g, 9,41 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,2 ml, 28,2 mmol) en ácido acético (40 ml). Se purificó cromatografía en CH_2Cl_2 , seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 874 mg de un sólido amarillo claro (28 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 7,55-7,74 (m, 2H); 7,47-7,54 (m, 2H); 7,34 (dd, $J=1,7$, 7,8 Hz, 1H); 7,13 (dt, $J=1,2$, 7,7 Hz, 1 H, 7,08 (dd, $J=1,0$, 8,4 Hz, 1H); 4,29 (d, $J=12$ Hz, 1H); 4,11 (d, $J=12$ Hz, 1H); 3-80 (s, 3H). EM (ES): m/z 335,0 (M^+).

35

2-clorometilo-3-(2-clorofenil)-8-trifluorometil-3H-quinazolin-4-ona (2m)

Preparado conforme al Procedimiento B con 1m (500 mg, 1,59 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,38 ml, 4,77 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante recristalización en isopropanol para proporcionar 359 mg de un sólido cristalino blanco (61 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,51 (dd, $J=1,0$, 8,0 Hz, 1H); 8,14 (d, $J=7,3$ Hz, 1H); 7,65 (dd, $J=2,5$, 5,6 Hz, 1H); 7,62 (d, $J=3,9$ Hz, 1H); 7,48-7,60 (m, 3H); 4,44 (d, $J=12$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J=12$ Hz, 1H). EM (ES): m/z 373,0 (M^+).

40 **2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-benzo[g]quinazolin-4-ona (2n)**

Preparado conforme al Procedimiento B con 1n (500 mg, 1,68 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,40 ml, 5,05 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó cromatografía en CH_2Cl_2 , seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 232 mg de un sólido marrón claro (39 %). RMN ^1H (CDCl_3) δ : 8,92 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 8,81 (d, $J=8,3$, 1H); 8,32 (d, $J=8,3$ Hz, 1H); 7,51-7,69 (m, 4H); 7,55 (d, $J=5,2$ Hz, 1H); 7,53 (d, $J=3-8$ Hz, 1H); 4,43 (d, $J=12$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J=12$ Hz, 1H). EM (ES): m/z 355,0 (M^+).

50

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-7-nitro-3H-quinazolin-4-ona (2o)

Preparado conforme al Procedimiento B con 1o (500 mg, 1,71 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,41 ml, 5,14 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante extracción en K_2CO_3 acuoso seguido de dos cromatografías en CH_2Cl_2 , para proporcionar 338 mg de un aceite amarillo (56 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,64 (d, $J=2,2$ Hz, 1H); 8,48 (d, $J=8,8$ Hz, 1H); 8,32 (dd, $J=2,2$, 8,7 Hz, 1H); 7,66 (dd, $J=2,5$, 6,0 Hz, 1H); 7,52-7,59 (m, 3H); 4,41 (d, $J=12$ Hz, 1H), 4,10 (d, $J=12$ Hz, 1H). EM (ES): m/z 350,0 (M^+).

55 **Éster 2-clorometil-3-(2-clorofenil)-4-oxo-3,4-dihidro-quinazolin-6-ílico de ácido acético (2p)**

Preparado conforme al Procedimiento B con 1p (670 mg, 2,55 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,61 ml, 7,65 mmol) en ácido acético (10 ml). Se purificó mediante cromatografía en 0-3 % de $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, seguida de recristalización con isopropanol para proporcionar 523 mg del acetato en forma de cristales de color melocotón claro (57 %). RMN de ^1H (CDCl_3) δ : 8,00 (d, $J=2,7$ Hz, 1H); 7,82 (d, $J=8,8$ Hz, 1H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,56 (dd, $J=2,7$, 8,8 Hz, 1H); 7,51 (t, $J=4,7$

65

Hz, 2H); 7,50 (s, 1H); 4,38 (d, J=12 Hz, 1 H), 4,08 (d, J=12 Hz, 1H); 2,36 (s, 3H). EM (ES): m/z 363,0 (M+).

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-6,7-difluoro-3H-quinazolin-4-ona (2q)

5 Preparado conforme al Procedimiento B con 1q (700 mg, 2,48 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,60 ml, 7,43 mmol) en ácido acético (12 ml). Se purificó cromatografía en CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 219 mg de un sólido cristalino amarillo (26 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 8,07 (dd, J=8,5, 9,7 Hz, 1H); 7,64 (dd, J=2,5, 5,6 Hz, 1H); 7,60 (dd, J=3,5, 11 Hz, 1H); 7,55 (q, J=2,9 Hz, 3H); 7,52 (d, J=1,9 Hz, 1H); 7,49-7,51 (m, 1H); 4,36 (d, J=12 Hz, 1 H), 4,06 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 341,0 (M+).

10

2-clorometil-3-(2-clorofenil)-6-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (2r)

15 Preparado conforme al Procedimiento B con 1r (850 mg, 3,21 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,77 ml, 9,63 mmol) en ácido acético (15 ml). Se purificó mediante extracción de K₂CO₃ acuoso, seguido de cromatografía en EtOAc/hexanos. Una segunda cromatografía en acetona/hexanos proporcionó 125 mg de un sólido blanco (12 %). RMN de ¹H (CDCl₃) δ: 7,95 (dd, J=2,9, 8,2 Hz, 1H); 7,81 (dd, J=4,8, 9,0 Hz, 1H); 7,61-7,66 (m, 1H); 7,57 (dd, J=2,7, 8,6 Hz, 1H); 7,57 (dd, J=2,7, 8,6 Hz, 1H); 7,52 (dd, J=3,2, 6,9 Hz, 1H); 7,52 (s a; 2H); 4,38 (d, J=12 Hz, 1H), 4,08 (d, J=12 Hz, 1H). EM (ES): m/z 323,0 (M+).

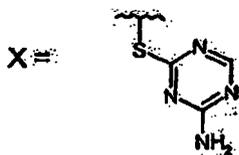
20 EJEMPLO 10

Preparación de compuestos inhibidores de PI3Kδ

25 Los compuestos siguientes de la presente invención se prepararon como se indica en el procedimiento C usando 2-clorometil-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (10 mg), el nucleófilo XH adecuado (20 mg, exceso) y carbonato potásico (10 mg) en DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se agitó 16 horas a temperatura ambiente, se inactivó con agua, y el producto sólido bruto se recogió por filtración y se secó al aire. El material bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó mediante HPLC de fase inversa (columna C18 Luna 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, 10-75 % de acetonitrilo/agua en 15 minutos, 100 % de acetonitrilo a 18 minutos, detector a 220 λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para dar los productos finales.

30

2-(4-amino-1,3,5-triazin-2-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-087)



35

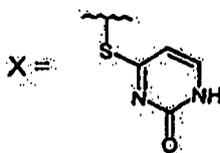
Rendimiento: 5,8 mg.

RMN de ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,10 (s, 1H), 7,70 (t, J=7,8 Hz, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,52 (d, J=8,0 Hz, 1H), 7,48-7,26 (m, 6H), 4,08 (s, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H).

LREM (ES pos.) m/z = 391 (M+1).

40

5-metilo-2-(2-oxo-1,2-dihidro-pirimidin-4-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-089)



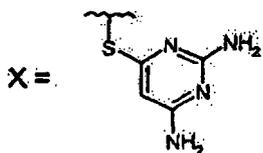
45

Rendimiento: 2,4 mg.

RMN de ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 11,49 (s, 1H), 7,70 (t, J=7,8 Hz, 1H), 7,60 (t a, =6,0 Hz, 1H), 7,53-7,48 (m, 2H), 7,46-7,28 (m, 4H), 6,31 (d, J=6,7 Hz, 1H), 4,05 (s, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H).

LREM (ES pos.) m/z = 391 (M+1).

50

2-(2,6-diamino-pirimidin-4-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-093)

- 5 RMN de ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 7,70 (t, $J=7,7$ Hz, 1H), 7,54 (d, $J=8,0$ Hz, 1H), 7,45-7,27 (m, 5H), 6,22 (s a, 1H), 5,80 (s a, 1H), 3,99 (AB cuartete, $J_{AB} = 14,6$ Hz, $\Delta\nu = 26,9$ Hz, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,08 (s, 3H).
LREM (ES pos.) $m/z = 405$ (M+1).

5-metil-2-(1-metil-1H-imidazol-2-ilsulfanilmetilo)-3-o-tolilo-3H-quinazolin-4-ona (D-097)

10



- RMN de ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 7,69 t, $J=7,8$ Hz, 1H), 7,46-7,37 (m, 5H), 7,32 (d, $J=7,3$ Hz, 1H), 7,20 (d, $J=1,0$ Hz, 1H), 6,48 (d, $J=1,0$ Hz), 3-83 (AB cuartete, $J_{AB} = 15,0$ Hz, $\Delta\nu = 18,8$ Hz, 1H), 3,55 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H).
LREM (ES pos.) $m/z = 364$ (M+1).

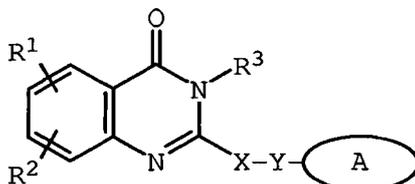
15

5-metil-3-o-tolil-2-(1H-[1,2,4]triazol-3-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-098)

- 20 RMN de ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 13,98 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,70 (t, $J=7,8$ Hz, 1H), 7,49 (d, $J=7,9$ Hz, 1H), 7,44-7,31 (m, 5H), 4,04 (AB cuartete, $J_{AB} = 15,5$ Hz, $\Delta\nu = 19,1$ Hz, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,10 (s, 3H).
LREM (ES pos.) $m/z = 364$ (M+1).

REIVINDICACIONES

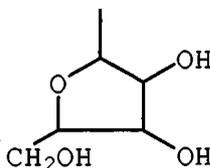
1. Un compuesto que tiene una fórmula estructural general:



5

en el que el sistema de anillo A se selecciona del grupo que consiste en imidazolilo, pirazolilo, 1,2,3-triazolilo, piridizinilo, pirimidinilo, pirazinilo, 1,3 5-triazinilo, cinnolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 1,8-naftiridinilo, pteridinilo, 1H-indazolilo y benzimidazolilo,

10 cada uno de los cuales puede estar no sustituido o sustituido opcionalmente con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en $N(R^a)_2$, halo, alquilo C_{1-3} , S (alquilo C_{1-3}), OR^a , halo y



15 en el que X se selecciona del grupo que consiste en CHR^b , CH_2CHR^b y $CH=C(R^b)$;

Y se selecciona del grupo que consiste en nada, SO, SO_2 , NH, O, $C(=O)$, $OC(=O)$, $C(=O)O$ y $NHC(=O)CH_2S$;

18 R^1 y R^2 , independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, halo, $NHC(=O)$ alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, NO_2 , OR^a , OCF_3 , N $(R^a)_2$, CN, $OC(=O)R^a$, $C(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, arilo OR^b , Het, $NR^aC(=O)$ alquilenilo $C_{1-3}C(=O)OR^a$, ariloalquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, ariloC $(=O)R^a$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$, Oalquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$, alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^a$, $C(=O)NR^aSO_2R^a$, alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{2-6}N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}Het$, Oalquilenilo $C_{2-4}N(R^a)_2$, Oalquilenilo $C_{1-4}CH(OR^b)CH_2N(R^a)_2$, Oalquilenilo $C_{1-4}Het$, Oalquilenilo $C_{2-4}OR^a$, Oalquilenilo $C_{2-4}NR^aC(=O)OR^a$, $NR^aC_{1-4}alquileniloN(R^a)_2$, $NR^aC(=O)R^a$, $NR^aC(=O)N(R^a)_2$, N $(SO_2alquilo C_{1-4})_2$, $NR^a(SO_2alquilo C_{1-4})$, $SO_2N(R^a)_2$, OSO_2CF_3 , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, alquilenilo $C_{1-4}Het$, alquilenilo $C_{1-6}OR^b$, alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, $C(=O)N(R^a)_2$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}arilo$, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , ariloC $(=O)R^b$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}heterocicloalquilo C_{3-8}$, $NHC(=O)alquilenilo C_{1-3}Het$, Oalquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^b$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}Het$ y $NHC(=O)haloalquilo C_{1-6}$; o

25 R^1 y R^2 se unen para forman un componente con una cadena de alquilenilo o alquilenilo de 3 ó 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

30 R^3 es hidrógeno o se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilenilo $C_{1-4}cicloalquilo$, alquilenilo C_{2-6} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, arilalquilo C_{1-3} , $C(=O)R^a$, arilo, heteroarilo, $C(=O)OR^a$, $C(=O)N(R^a)_2$, $C(=S)N(R^a)_2$, SO_2R^a , $SO_2N(R^a)_2$, $S(=O)R^a$, $S(=O)N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilenilo $C_{1-4}Het$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}arilo$, $C(=O)alquilenilo C_{1-4}heteroarilo$, alquilenilo $C_{1-4}arilo$, alquilenilo $C_{1-4}Het$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)alquilenilo C_{1-4}arilo$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)alquilenilo C_{1-4}heteroarilo$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)Het$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{1-4}OR^a$, alquilenilo $C_{1-4}NR^aC(=O)R^a$, alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}OR^a$, alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilenilo $C_{1-4}C(=O)OR^a$ y alquilenilo $C_{1-4}Oalquilenilo C_{1-4}C(=O)OR^a$; cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, OR^a , alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, NO_2 , $N(R^a)_2$, $NR^aSO_2CF_3$, $NR^aC(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, $SO_2N(R^a)_2$, CN, $C(=O)R^a$, alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$, Oalquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$ y $N(R^a)alquilenilo C_{1-4}N(R^a)_2$;

40 o R^3 es alquilenilo C_{1-4} arilo opcionalmente sustituido con uno o más de halo, $SO_2N(R^a)_2$, $N(R^a)_2$, $C(=O)OR^a$, $NR^aSO_2CF_3$, CN, NO_2 , $C(=O)R^a$, OR^a , alquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$ y Oalquilenilo $C_{1-4}N(R^a)_2$;

45 R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilenilo $C_{1-3}N(R^a)_2$, arilo, arilalquilo C_{1-3} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$, heteroarilo, heteroarilalquilo C_{1-3} y alquilenilo $C_{1-3}heteroarilo$;

o dos grupos R^a se unen para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que opcionalmente puede contener al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, arilalquilo C_{1-3} , heteroarilalquilo C_{1-3} , alquilenilo $C_{1-3}arilo$ y alquilenilo $C_{1-3}heteroarilo$;

50 Het es un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros, saturado o parcial o totalmente insaturado que contiene al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido

con alquilo C₁₋₄ o C(=O)OR^a;

y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

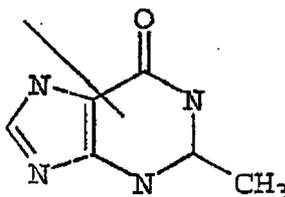
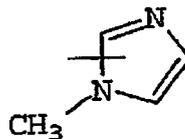
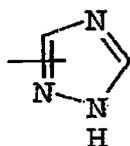
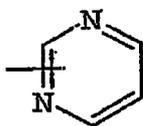
en donde "arilo", se define aquí como un grupo aromático monocíclico o policíclico que puede estar no sustituido o sustituido con uno o más, y en particular de uno a tres, halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo, y en donde "heteroarilo" se define como un sistema de anillo monocíclico o bicíclico que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un átomo de nitrógeno, de oxígeno o de azufre en un anillo aromático, que puede estar no sustituido o sustituido con uno o más, y en particular de uno a tres, halo, alquilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃), y C(CH₃)₂, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

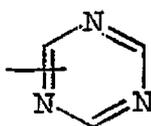
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y se selecciona del grupo que consiste en ninguno y NH; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el sistema del anillo A está no sustituido o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el anillo A se selecciona del grupo que consiste en

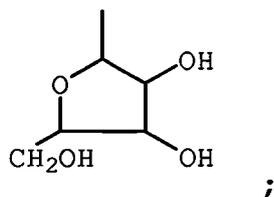


y



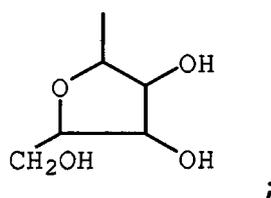
o su sal o un solvato farmacéuticamente aceptables.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el sustituyente del anillo A está sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en N(R^a)₂, halo, alquilo C₁₋₃, S(alquilo C₁₋₃), OR^a, halo y



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

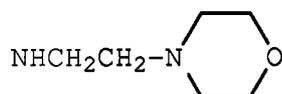
- 5 7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el sistema del anillo A está sustituido con de uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en NH_2 , $\text{NH}(\text{CH}_3)$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NHCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)$, Cl , F , CH_3 , SCH_3 , OH y



10 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se seleccionan, de forma independiente, del grupo que consiste en hidrógeno, OR^a , halo, alquilo C_{1-6} , CF_3 , NO_2 , $\text{N}(\text{R}^a)_2$, NR^a alquilenos $\text{C}_{1-3}\text{N}(\text{R}^a)_2$, y Oalquilenos $\text{C}_{1-3}\text{OR}^a$, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 15 9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se seleccionan, de forma independiente, de H , OCH_3 , Cl , Br , F , CH_3 , CF_3 , NO_2 , OH , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$,

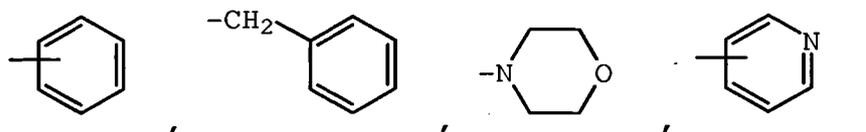


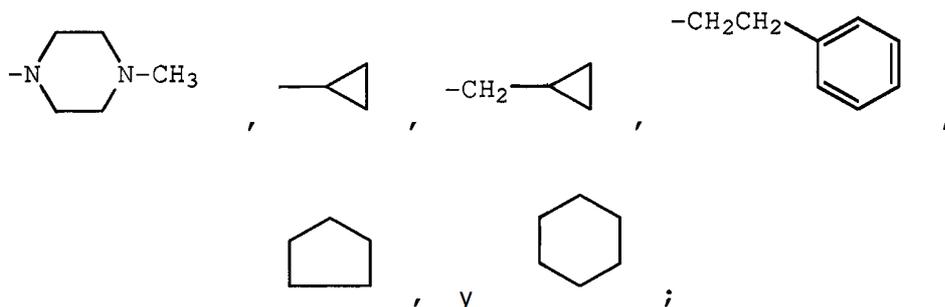
20 y $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^1 y R^2 se unen para formar un anillo de cinco o seis miembros; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 25 11. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , $\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$, alquilenos C_{1-4} Het, alquilen C_{1-4} -cicloalquilo, alquilen C_{1-4} arilo, alquilen $\text{C}_{1-4}\text{C}(=\text{O})$ alquilen C_{1-4} arilo, alquilen $\text{C}_{1-4}\text{C}(=\text{O})\text{OR}^a$, alquilen $\text{C}_{1-4}\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{R}^a)_2$, alquilen $\text{C}_{1-4}\text{C}(=\text{O})\text{Het}$, alquilenos $\text{C}_{1-4}\text{N}(\text{R}^a)_2$ y alquilenos $\text{C}_{1-4}\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$, o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 30 12. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R^3 se selecciona del grupo que consiste en OR^a , alquilo C_{1-6} , arilo, heteroarilo, NO_2 , $\text{N}(\text{R}^a)_2$, $\text{NR}^a\text{C}(=\text{O})\text{R}^a$, $\text{C}(=\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$, $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$,





o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 13. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en halo, OR^a, C₁₋₆alquilo, arilo, heteroarilo, NO₂, N(R^a)₂, NR^aSO₂CF₃, NR^aC(=O)R^a, C(=O)OR^a, SO₂N(R^a)₂, CN, C(=O)R^a, alquilenos C₁₋₄N(R^a)₂, Oalquilenos C₁₋₄N(R^a)₂ y N(R^a)alquilenos C₁₋₄N(R^a)₂; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo
- 10 14. El compuesto de la reivindicación 5, en el que R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en Cl, F, CH₃, CH(CH₃)₂, OCH₃, C₆H₅, NO₂, NH₂, NHC(=O)CH₃, CO₂H y N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)₂; o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 15 15. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 16. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15 para su uso en terapia.
- 25 17. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para usar en un método para mejorar un trastorno de reabsorción ósea en un animal.
- 30 18. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho trastorno de reabsorción ósea es osteoporosis.
- 35 19. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para usar en un método para inhibir el crecimiento o la proliferación de células de leucemia mielógena crónica.
- 40 20. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de
- i) isquemia, preferentemente a causa de una parada cardiaca, infarto de miocardio, obstrucción de una arteria coronaria, oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, lesión por traumatismo craneoencefálico, edema y tumor cerebral,
 - ii) lesión por reperfusión, preferentemente asociada con ictus vascular, shock hemorrágico, infarto o isquemia de miocardio, trasplante de órganos y vasoespasmo cerebral,
 - iii) enfermedades óseas, preferentemente seleccionadas de osteoporosis, enfermedad de Paget y trastornos de reabsorción ósea relacionados,
 - iv) cánceres hematopoyéticos, preferentemente;
 - 45 a) linfomas seleccionados preferentemente de linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfomas linfocíticos;
 - b) mielomas múltiples
 - c) leucemias seleccionadas preferentemente de leucemias linfocíticas, leucemias (mielógenas) mieloides crónicas,
 - 50 v) enfermedades relacionadas con la liberación de histamina, seleccionadas preferentemente de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, SDRA y enfisema,
 - vi) enfermedades artríticas, preferentemente seleccionadas de artritis reumatoide, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis,
 - vii) enfermedad de Behcet,
 - viii) septicemia, shock séptico, shock endotóxico, septicemia por gramnegativos, septicemia por grampositivos y síndrome del shock tóxico,
 - ix) síndrome de disfunción orgánica múltiple secundario a septicemia, traumatismo o hemorragia,
 - x) trastornos oftálmicos, seleccionados preferentemente de conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y

- oftalmopatía asociada con la tiroides,
 xi) granuloma eosinofílico,
 xii) trastornos respiratorios o pulmonares, seleccionados preferentemente de asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica SDRA, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasia y toxicidad del oxígeno del pulmón,
 5 xiii) fibrosis, preferentemente fibrosis cística,
 xiv) formación de queloides o formación de tejido de cicatriz,
 xv) aterosclerosis
 10 xvi) enfermedades autoinmunes, seleccionadas preferentemente de lupus sistémico eritematoso (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Reynaud,
 xvii) trastornos de rechazo de trasplantes, seleccionados preferentemente de EICH y rechazo de aloinjertos,
 xviii) glomerulonefritis crónica,
 15 xix) enfermedades inflamatorias del intestino, seleccionadas preferentemente de enfermedad intestinal inflamatoria crónica (EIIc), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante,
 xx) dermatosis inflamatorias seleccionadas preferentemente de dermatitis por contacto, dermatitis atópica, psoriasis y urticaria,
 xxi) fiebre y mialgias debido a una infección,
 20 xxii) trastornos inflamatorios de los sistemas nerviosos central o periférico, seleccionados preferentemente de meningitis, encefalitis y lesiones cerebrales o de la médula espinal debidas a traumatismos leves,
 xxiii) síndrome de Sjogren,
 xxiv) enfermedades que implican una diapedesis leucocitaria,
 xxv) hepatitis alcohólica,
 xxvi) neumonía bacteriana,
 25 xxvii) enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo,
 xxviii) shock hipovolémico,
 xxix) diabetes mellitus de tipo I,
 xxx) hipersensibilidad aguda y retardada,
 30 xxxi) estados de enfermedad provocados por discrasia leucocitaria y metástasis,
 xxxii) lesión térmica,
 xxxiii) síndromes asociados con la transfusión de granulocitos y
 xxxiv) y toxicidad inducida por citocinas.
21. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para el tratamiento de una enfermedad
 35 seleccionada del grupo que consiste en leucemia, linfoma y mieloma múltiple.
22. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para el tratamiento de una enfermedad
 40 seleccionada del grupo que consiste en linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico, mieloma múltiples, leucemia linfocítica y leucemia (mielógena) mieloide crónica.
23. Un compuesto o una composición de acuerdo con la reivindicación 16 para el tratamiento de una enfermedad
 seleccionada del grupo que consiste en EPOC, asma, artritis reumatoide, diabetes, rinitis alérgica y esclerosis múltiple.

FIGURA 1

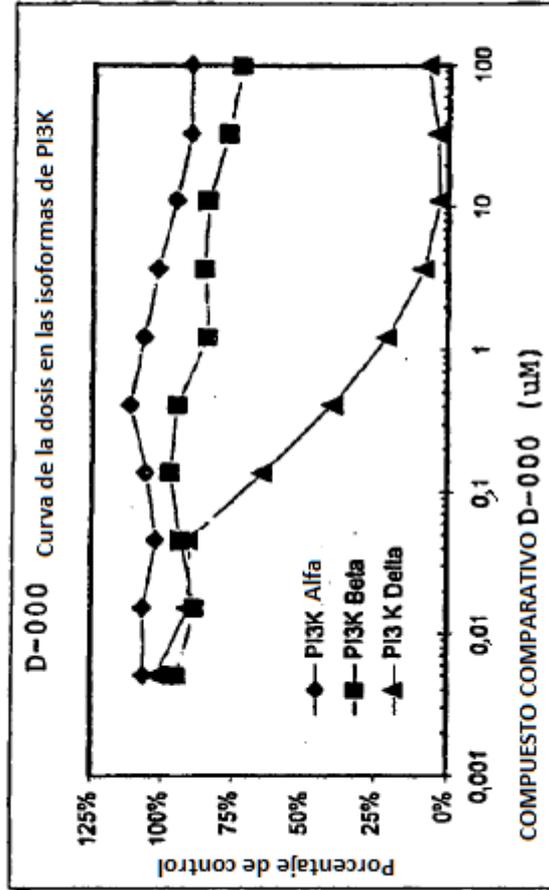


FIGURA 2

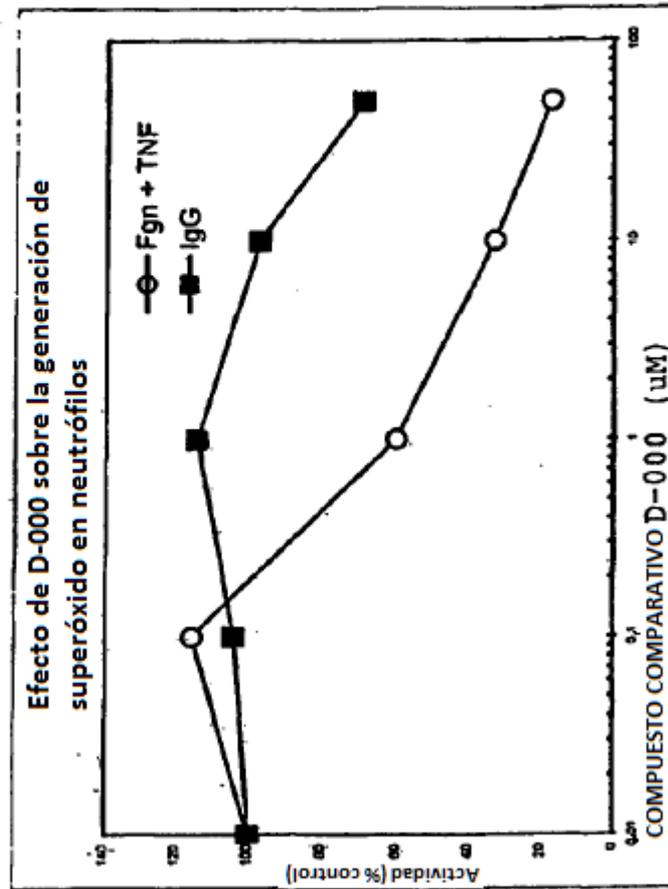


FIGURA 3

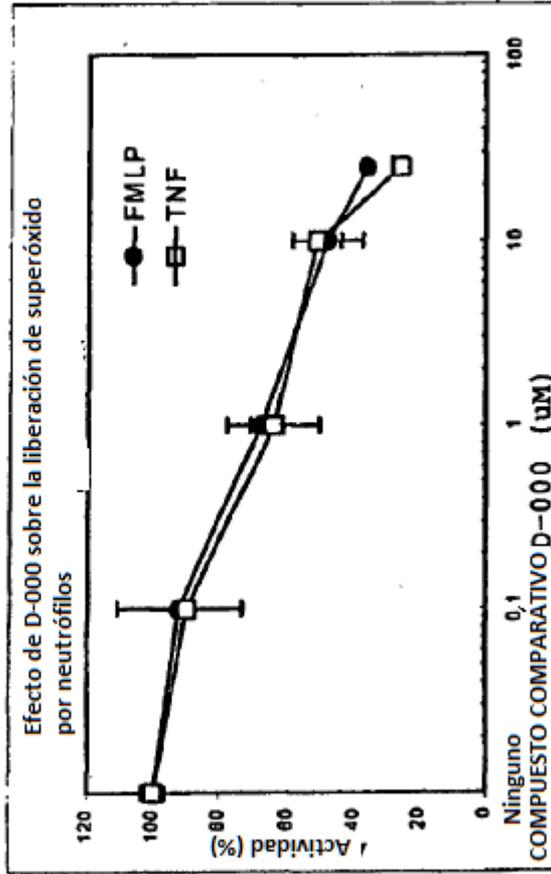


FIGURA 4

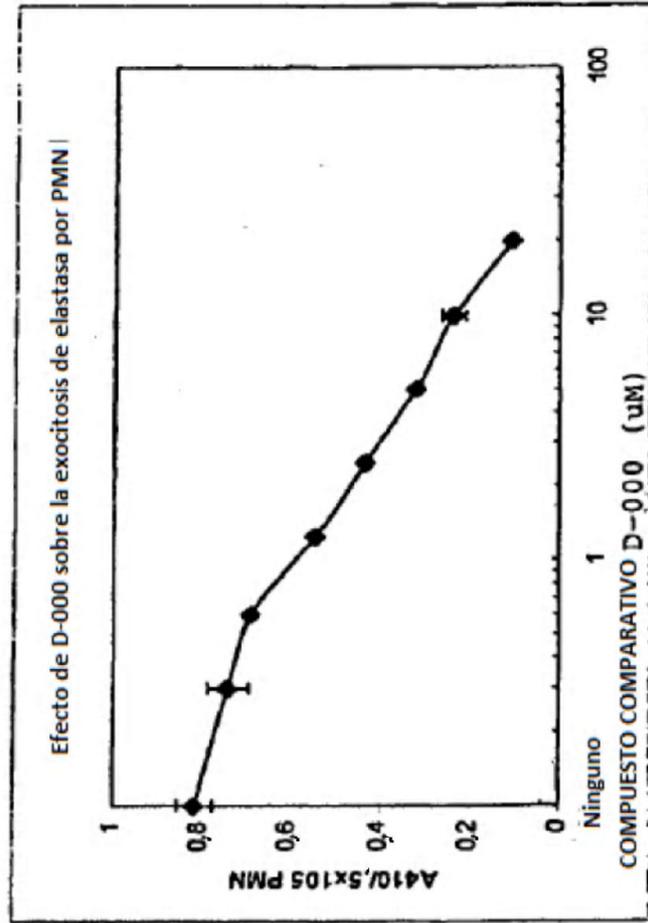


FIGURA 5

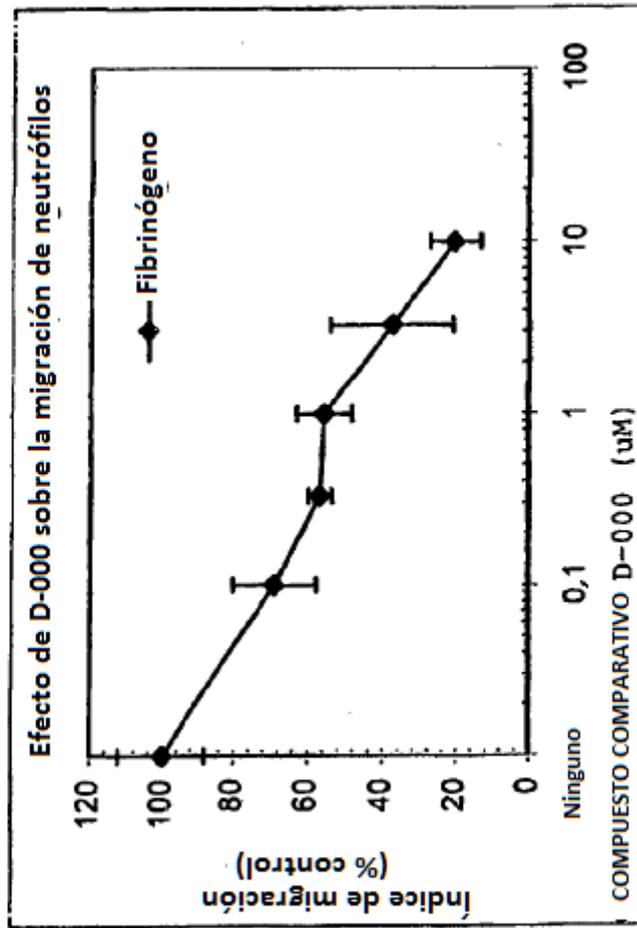


FIGURA 6

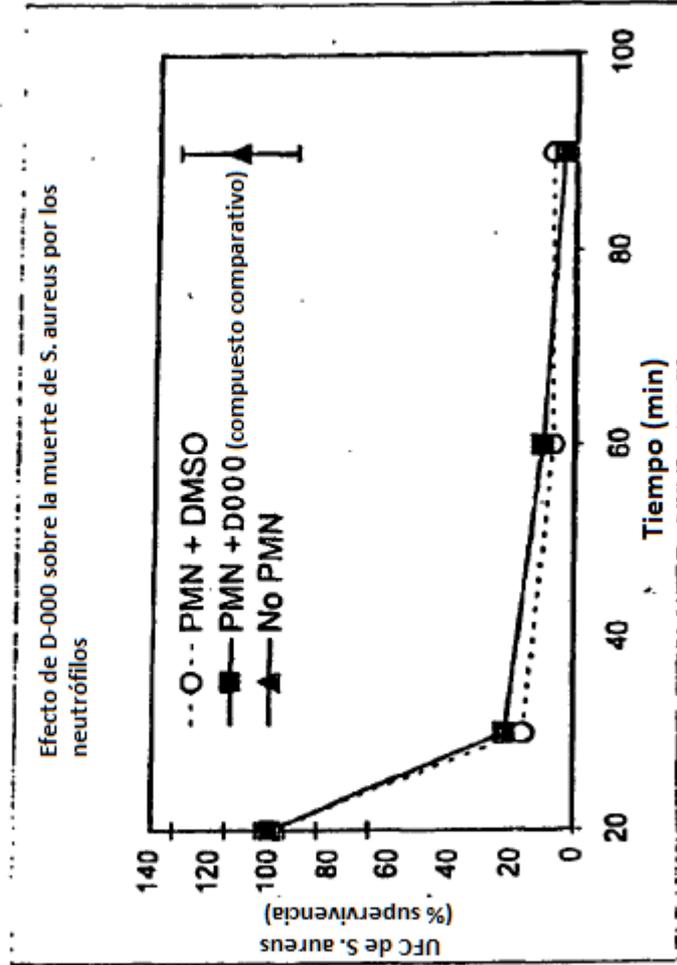


FIGURA 7

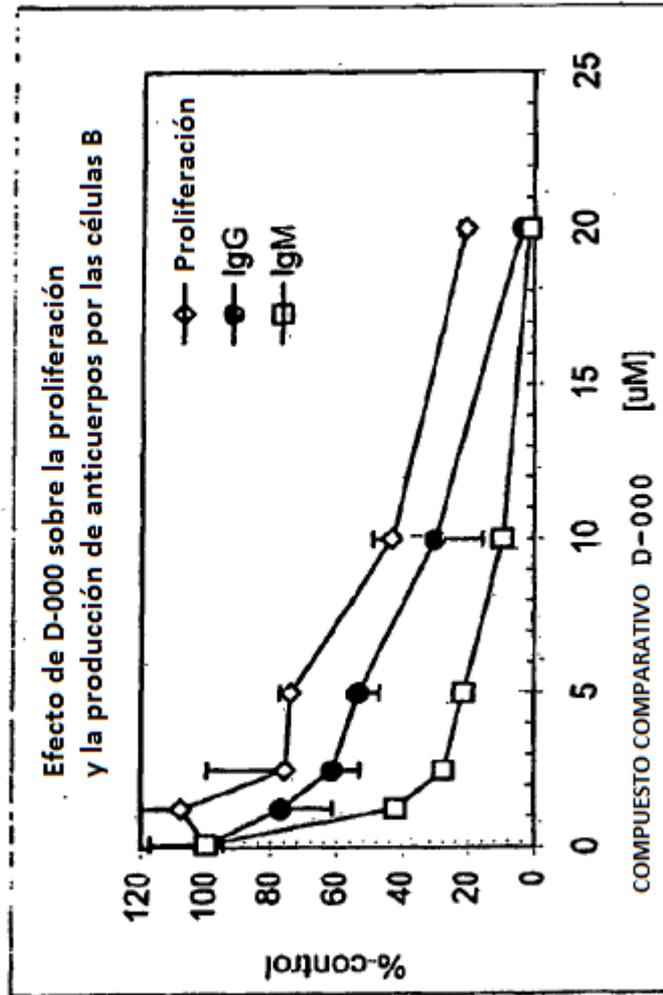
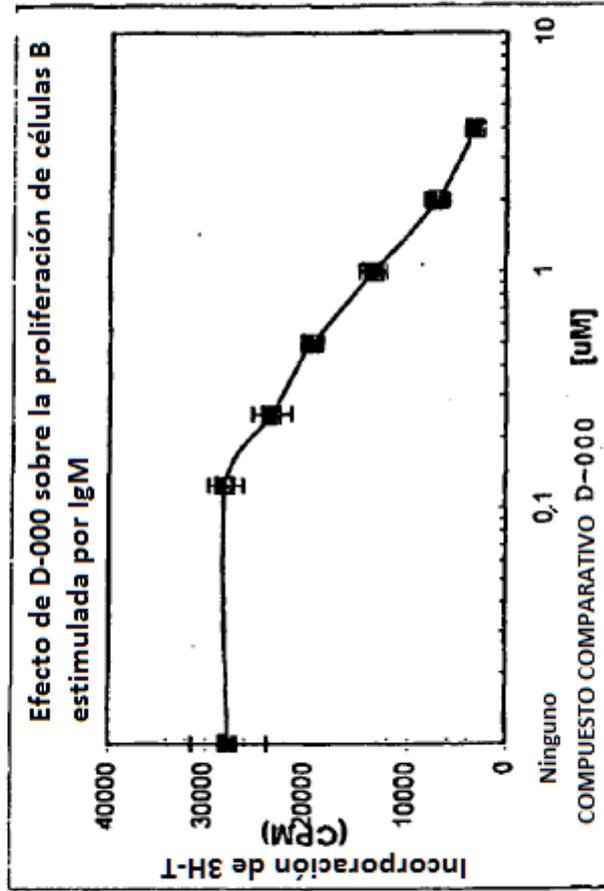


FIGURA 8



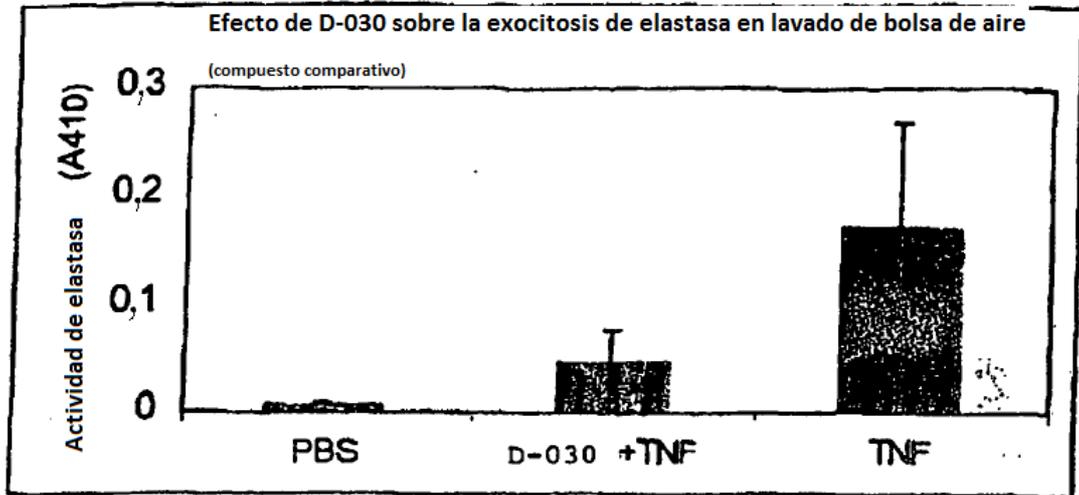


FIGURA 9