

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 260**

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 10163434 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2223922**

54 Título: **Inhibidores de la fosfatidilinositol 3-quinasa delta 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:
21.04.2016

73 Titular/es:

ICOS CORPORATION (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis IN 46285, US

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 567 260 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 fosfatidilinositol 3-quinasa delta 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 y a métodos de uso de tales materiales.

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)).

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, 375:599-602 (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 n° 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.

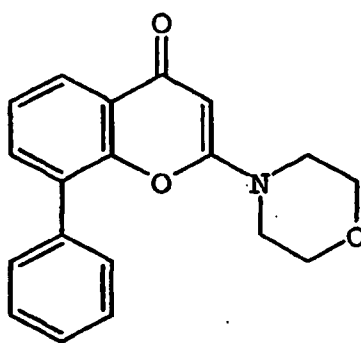
En la publicación internacional WO 96/25488, se describe un polipéptido constitutivamente activo de PI3K. Esta publicación divulga la preparación de una proteína de fusión quimérica en la que un fragmento del residuo 102 de la p85, conocido como región inter-SH2 (iSH2), se fusiona a través de una región 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 quinastas 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).

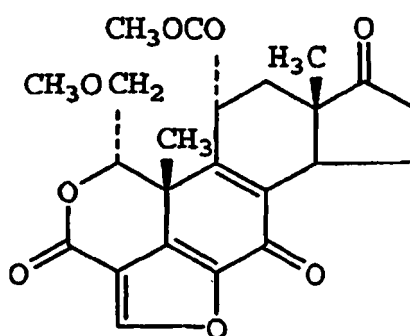
Asimismo, parece que la PI3-quinasa está implicada en una serie de aspectos de la activación leucocitaria. Se ha mostrado que una actividad PI3-quinasa asociada con p85 se asocia físicamente con el dominio citoplásmico del CD28, que es una importante molécula co-estimuladora para la activación de linfocitos 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 1-100 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 El documento WO 94/17090 describe derivados de 2,6-diaminopurina para uso como agentes anti-inflamatorios, de manera particular en el tratamiento de pacientes con afecciones inflamatorias que son susceptibles a daños tisulares inducidos por leucocitos.

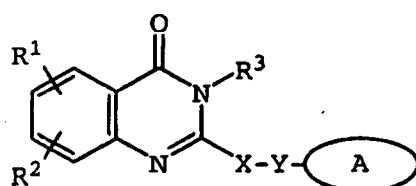
10 En vista de las consideraciones anteriores, está claro que no se dispone de suficiente información acerca de las características estructurales y funcionales de las enzimas PI 3-quinasa, incluyendo la localización subcelular, los estados de activación, las afinidades por el sustrato y similares. Además, 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
15 segregar 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.

20 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
25 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.

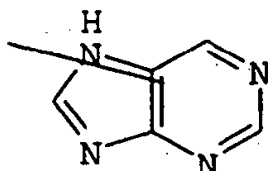
30 Un aspecto de la presente invención consiste en proporcionar compuestos que puedan inhibir la actividad biológica de la PI3K δ humana. Otro aspecto de la invención consiste en proporcionar compuestos que inhiban la PI3K δ de forma selectiva, manteniendo una potencia inhibidora relativamente baja con respecto a las demás isoformas de PI3K. Otro aspecto de la invención es proporcionar métodos de caracterización de la función de PI3K δ humana. Un aspecto de la divulgación es proporcionar métodos para modular selectivamente la actividad de PI3K δ humana, y promover así el
35 tratamiento médico de enfermedades mediadas por la disfunción de PI3K δ . Otros aspectos y ventajas de la invención se pondrán fácilmente de manifiesto para el profesional con los conocimientos normales en la técnica.

Sumario de la invención

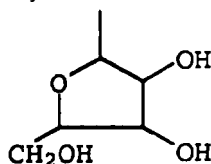
De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto que tiene una fórmula de estructura general



en la que A es



- 5 los cuales pueden estar sin sustituir o sustituidos con 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



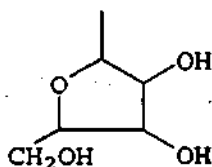
- 10 X se selecciona del grupo que consiste en CHR^b , CH_2CHR^b , y $CH=C(R^b)$;
Y es SO o SO_2 ;
 R^1 y R^2 , independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , acilo, heteroarilo, halo, $NHC(=O)$ alquilen $C_{1-3}N(R^a)_2$, NO_2 , OR^a , CF_3 , OCF_3 , $N(R^a)_2$, CN, $OC(=O)R^a$, $C(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, aril OR^b , Het, $NR^aC(=O)$ alquilen $C_{1-3}C(=O)OR^a$, aril Oalquilen $C_{1-3}N(R^a)_2$, aril $OC(=O)R^a$, alquilen $C_{1-4}C(=O)OR^a$, Oalquilen $C_{1-4}C(=O)OR^a$, alquilen C_{1-4} Oalquilen $C_{1-4}C(=O)OR^a$, $C(=O)NR^aSO_2R^a$, alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilen $C_{2-6}N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilen $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilen $C_{1-4}Het$, Oalquilen $C_{2-4}N(R^a)_2$, Oalquilen $C_{1-4}CH(OR^b)CH_2N(R^a)_2$, Oalquilen $C_{1-4}Het$, Oalquilen $C_{2-4}OR^a$, Oalquilen $C_{2-4}NR^aC(=O)OR^a$, NR^a alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, $NR^aC(=O)R^a$, $NR^aC(=O)N(R^a)_2$, N(SO_2 alquilo C_{1-4}), $NR^a(SO_2$ alquilo C_{1-4}), $SO_2N(R^a)_2$, OSO_2CF_3 , alquilen C_{1-3} arilo, alquilen $C_{1-4}Het$, alquilen $C_{1-6}OR^b$, alquilen $C_{1-3}N(R^a)_2$, $C(=O)N(R^a)_2$, $NHC(=O)$ alquilen C_{1-3} arilo, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , aril Oalquilen $C_{1-3}N(R^a)_2$, aril $OC(=O)R^b$, $NHC(=O)$ alquilen C_{1-3} heterocicloalquilo C_{3-8} , $NHC(=O)$ alquilen $C_{1-3}Het$, Oalquilen C_{1-4} Oalquilen $C_{1-4}C(=O)OR^b$, $C(=O)$ alquilen $C_{1-4}Het$ y $NHC(=O)$ halo C_{1-6} alquilo;
o R^1 y R^2 se unen para formar un componente con una cadena de alquilenilo o alquilenilo de 3 o 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;
25 R^3 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilen C_{1-4} cicloalquilo, alquilenilo C_{2-6} , alquilen C_{1-3} arilo, aril C_{1-3} alquilo, $C(=O)R^a$, arilo, heteroarilo, $C(=O)OR^a$, $C(=O)N(R^a)_2$, $C(=S)N(R^a)_2$, SO_2R^a , $SO_2N(R^a)_2$, $S(=O)R^a$, $S(=O)N(R^a)_2$, $C(=O)NR^a$ alquilen $C_{1-4}OR^a$, $C(=O)NR^a$ alquilen $C_{1-4}Het$, $C(=O)$ alquilen C_{1-4} arilo, $C(=O)$ alquilen C_{1-4} heteroarilo, alquilen 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 , alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, y Oalquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilen C_{1-4} heteroarilo, alquilen $C_{1-4}Het$, alquilen $C_{1-4}C(=O)$ alquilen C_{1-4} arilo, alquilen $C_{1-4}C(=O)$ alquilen C_{1-4} heteroarilo, alquilen $C_{1-4}C(=O)Het$, alquilen $C_{1-4}C(=O)N(R^a)_2$, alquilen $C_{1-4}OR^a$, alquilen $C_{1-4}NR^aC(=O)R^a$, alquilen C_{1-4} Oalquilen $C_{1-4}OR^a$, alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, alquilen $C_{1-4}C(=O)OR^a$ y alquilen C_{1-4} Oalquilen $C_{1-4}C(=O)OR^a$;
 R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_{1-6} , cicloalquilo C_{3-8} , heterocicloalquilo C_{3-8} , alquilen $C_{1-3}N(R^a)_2$, arilo, aril C_{1-3} alquilo, alquilen C_{1-3} arilo, heteroarilo, heteroaril C_{1-3} alquilo y alquilen 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, aril C_{1-3} alquilo, heteroaril C_{1-3} alquilo, alquilen C_{1-3} arilo, y alquilen C_{1-3} heteroarilo;
40 Het es un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros, saturado o parcial o totalmente insaturado, que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, y alquilo C_{1-4} opcionalmente sustituido o $C(=O)OR^a$;
y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,
en el que "arilo" se define como un grupo aromático monocíclico o bicíclico; que puede estar, o bien sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcóxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinito y alquilsulfonilo
45 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, y que puede estar, o bien sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo.

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

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

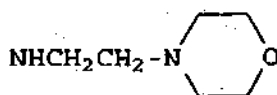
10



De forma conveniente, R1 y R2 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, OR^a, halo, alquilo C₁₋₆, CF₃, NO₂, N(R^a)₂, NR^aalquilen C₁₋₃N(R^a)₂ y Oalquilen C₂₋₄OR^a.

15

Preferentemente, R1 y R2 se seleccionan independientemente entre H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

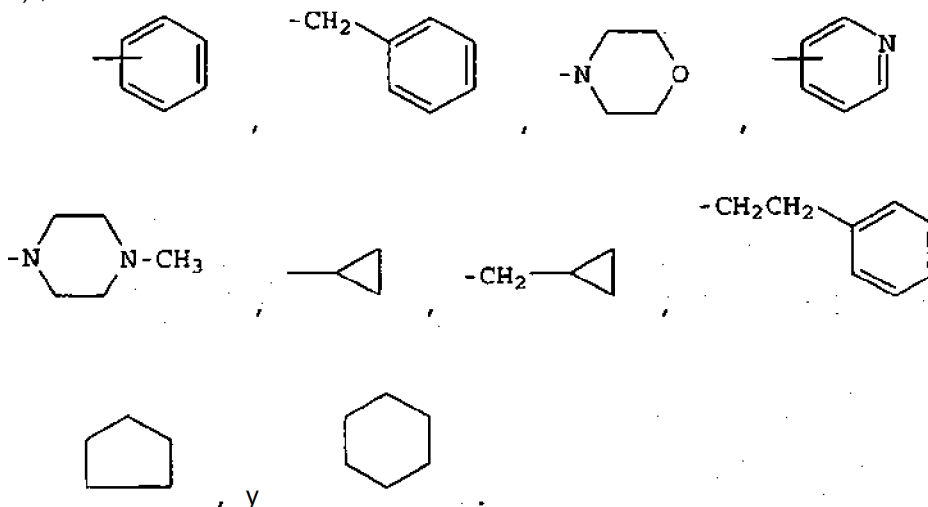


- 20 y O(CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

De forma conveniente, R1 y R2 se toman juntos para formar un anillo de cinco o seis miembros.

- 25 De forma ventajosa, R3 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₅, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)Het, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂ y alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a.

- 30 Preferentemente, R3 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, C(=O)OC₂H₅, CH₂CH(CH₃)₂,



De forma ventajosa, R3 está sustituido con un sustituyente seleccionado entre el 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, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, y N(R^a)alquilen C₁₋₄N(R^a)₂.

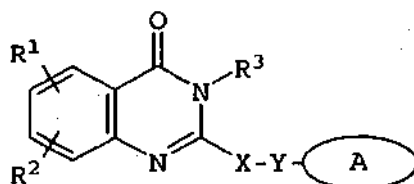
35

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

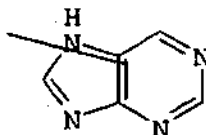
5 Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un compuesto o composición de acuerdo con la invención para uso en terapia.

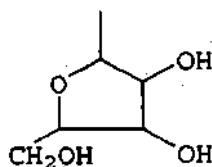
10 La presente invención también proporciona un compuesto que tiene una fórmula estructural general



en la que A es



15 que está, o bien sin sustituir o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en N(R^a)₂, halo, alquilo C₁₋₃, S(alquilo C₁₋₃), OR^a, halo, y



20 X se selecciona entre el grupo que consiste en CHR^b, CH₂CHR^b y CH=C(R^b);
Y se selecciona entre el grupo que consiste en S, SO o SO₂;

25 R1 y R2, se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, halo, NHC(=O)alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, NO₂, OR^a, CF₃, OCF₃, N(R^a)₂, CN, OC(=O)R^a, C(=O)R^a, C(=O)OR^a, aril OR^b, Het, NR^aC(=O)alquilen C₁₋₃C(=O)OR^a, aril Oalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, aril OC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, C(=O)NR^aSO₂R^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₂₋₆N(R^a)₂, C(=O)-NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄N(R^a), Oalquilen C₁₋₄CH(OR^b)CH₂N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄OR^a, Oalquilen C₂₋₄NR^aC(=O)OR^a, NR^aalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, NR^aC(=O)R^a, NR^aC(=O)N(R^a)₂, N(SO₂alquilo C₁₋₄)₂, NR^a(SO₂alquilo C₁₋₄), SO₂N(R^a)₂, OSO₂CF₃, alquilen C₁₋₃arilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₆OR^b, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, C(=O)N(R^a)₂, NHC(=O)alquilen C₁₋₃arilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, aril-Oalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, aril OC(=O)R^b, NHC(=O)alquilen C₁₋₃-heterocicloalquilo C₃₋₈, NHC(=O)alquilen C₁₋₃Het, Oalquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^b, C(=O)alquilen C₁₋₄Het y NHC(=O)halo C₁₋₆alquilo;

30 o R1 y R2 se toman juntos para formar un componente de cadena de alquilen o alqueno de 3 o 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

35 R3 se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, y alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alqueno C₂₋₆, alquilen C₁₋₃arilo, C(=O)R^a, heteroarilo, C(=O)OR^a, C(=O)N(R^a)₂, C(=S)N(R^a)₂, SO₂R^a, SO₂N(R^a)₂, S(=O)R^a, S(=O)N(R^a)₂, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄arilo opcionalmente sustituido con uno o más de halo, SO₂N(R^a)₂, N(R^a)₂, C(=O)OR^a, NR^aSO₂CF₃, CN, NO₂, C(=O)R^a, OR^a, alquilen C₁₋₄-N(-R^a)₂, y Oalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄-C(=O)Het, alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a; y alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a;

45 R^a se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, arilo, aril C₁₋₃alquilo, alquilen C₁₋₃arilo, heteroarilo, heteroaril C₁₋₃ alquilo y alquilen

C₁₋₃heteroarilo;

o dos grupos R^a se toman juntos para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, aril C₁₋₃alquilo, heteroaril C₁₋₃alquilo, alquilen C₁₋₃arilo, y alquilen C₁₋₃heteroarilo;

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;

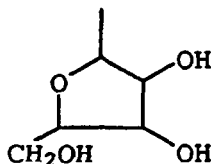
y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

en el que "arilo", se define aquí como un grupo aromático monocíclico o bicíclico que puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonylo,

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, y que puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonylo.

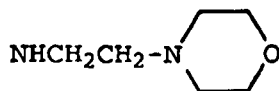
Preferentemente, X se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃) y C(CH₃)₂.

De forma ventajosa, el sistema del anillo A está sustituido con 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



De forma conveniente, 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, NR^aalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, y Oalquilen C₂₋₄-OR^a.

De forma ventajosa, R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

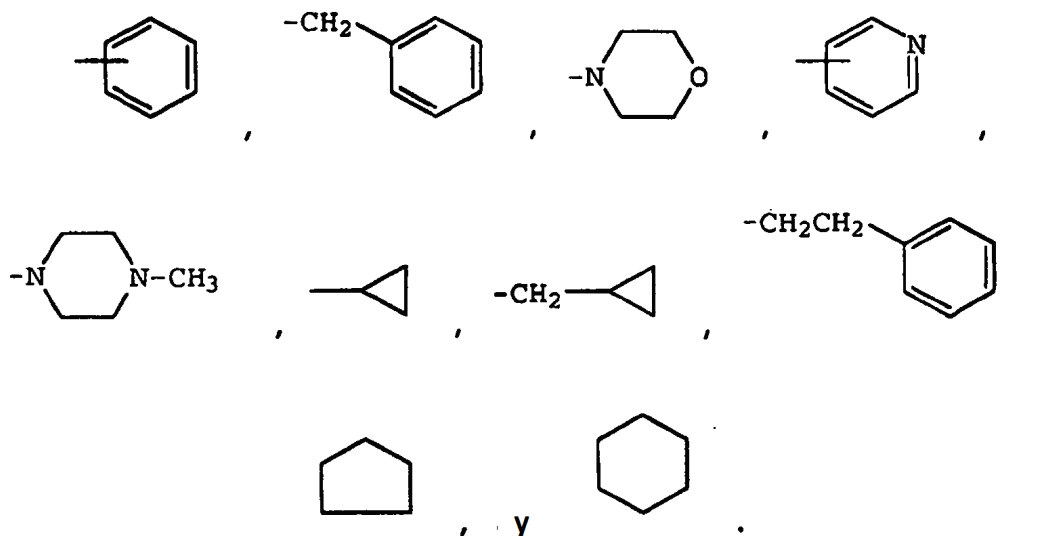


y O (CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

Preferentemente, R¹ y R² se toman juntos para formar un anillo de cinco o seis miembros.

De forma conveniente, R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄ Het, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, 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.

De forma ventajosa, 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 conveniente, R^3 está 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 , $C(=O)R^a$, alquilen C_{1-4} (R^a)₂, O-alquilen C_{1-4} $N(R^a)_2$ y $N(R^a)$ alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$.

Preferentemente, R^3 está sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en Cl , F , CH_3 , $CH(CH_3)_2$, OCH_3 , C_6H_5 , NO_2 , NH_2 , $NHC(=O)CH_3$, CO_2H , y $N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)_2$.

10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de $PI3K\delta$ de la invención sobre la actividad de tres isoformas de $PI3K$.

La Figura 2 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de $PI3K\delta$ 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 $PI3K\delta$ 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 $PI3K\delta$ sobre la exocitosis de elastasa en presencia de $fMLP$ por neutrófilos humanos.

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

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

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

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

La Figura 9 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de $PI3K\delta$ 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 $PI3K\delta$.

De particular beneficio son métodos para modular selectivamente la actividad de $PI3K\delta$ en el entorno clínico a fin de mejorar las enfermedades o trastornos mediados por la actividad de $PI3K\delta$. Así, el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una actividad excesiva o inapropiada de $PI3K\delta$ puede tratarse mediante el uso de moduladores selectivos de $PI3K\delta$.

Otros métodos incluyen permitir la caracterización adicional de la función fisiológica de la isoenzima. Además; la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores de $PI3K\delta$ selectivos. Los detalles de estas y otras realizaciones útiles de la invención se describen ahora.

Los compuestos descritos en el presente documento inhiben selectivamente y preferiblemente inhiben de forma

específica la actividad de PI3Kδ en las células, incluyendo las células *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Las células incluyen las que expresan PI3Kδ endógena, en el que endógeno indica que las células expresan PI3Kδ estando ausente la introducción recombinante en las células de uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido de PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo de la misma. Los métodos también abarcan el uso de células que expresan PI3Kδ exógena, en el que uno o más polinucleótidos que codifican PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo de la misma se han introducido en la célula mediante procedimientos recombinantes.

De particular ventaja, pero no reivindicado en este documento, las células pueden ser *in vivo*, es decir, en un sujeto vivo, por ejemplo, un animal o un ser humano, en donde un inhibidor de PI3Kδ puede utilizarse como agente terapéutico para inhibir la actividad de PI3Kδ en el sujeto. Alternativamente, las células pueden aislarse como células discretas o en un tejido, para métodos *ex vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vitro* también abarcados por la invención puede comprender la etapa de poner en contacto una enzima PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo de la misma con un compuesto inhibidor de la invención. La enzima PI3Kδ 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 PI3Kδ mediante tecnología recombinante) o se aísla de células modificadas mediante técnicas recombinantes para expresar la enzima exógena.

El término "inhibidor selectivo de PI3Kδ" utilizado aquí se refiere a un compuesto que inhibe la isoenzima PIKδ de forma más efectiva que las demás isoenzimas de la familia PI3K. Se entiende que un compuesto "inhibidor selectivo de PI3Kδ" es más selectivo para la PI3Kδ 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 PI3Kδ de forma selectiva se pueden emplear como inhibidores selectivos de PI3Kδ en los métodos revelados en el presente documento. Por otra parte, los compuestos de cualquier tipo que regulan negativamente la actividad o la expresión de PI3Kδ de forma selectiva y que poseen unas propiedades farmacológicas aceptables se pueden emplear como inhibidores selectivos de PI3Kδ 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 inhibitora 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 inhibitoras a través de determinaciones apropiadas de la actividad. Por ejemplo, en algunos contextos puede resultar deseable establecer una concentración inhibitora del 90 %, es decir CI₉₀, etc.

Por consiguiente, alternativamente se puede entender que un "inhibidor selectivo de PI3Kδ" se refiere a un compuesto que presenta una concentración inhibitora del 50 % (CI₅₀) con respecto a PI3Kδ, 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 PI3Kδ" se puede entender que se refiere a un compuesto inhibidor selectivo de PI3Kδ que presenta un valor CI₅₀ con respecto a PI3Kδ 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.

Entre otras cosas, la invención proporciona métodos para inhibir la función de los leucocitos. Más particularmente, la invención proporciona métodos para inhibir o suprimir las funciones de los neutrófilos y linfocitos T y B. Con respecto a los neutrófilos, se ha encontrado inesperadamente que la inhibición de la actividad de PI3Kδ inhibe las funciones de los neutrófilos. Por ejemplo, se ha observado que los compuestos de la invención provocan la inhibición de funciones de los neutrófilos clásicas, tales como la liberación de superóxido estimulada, exocitosis estimulada y la migración quimiotáctica. Sin embargo, se ha observado, además, que el método de la invención permite la supresión de determinadas funciones de los neutrófilos, mientras que no afecta sustancialmente otras funciones de estas células. Por ejemplo, se ha observado que la fagocitosis de las bacterias por los neutrófilos no se inhibe sustancialmente por los compuestos inhibidores de PI3Kδ selectivos de la invención.

Por lo tanto, la divulgación incluye métodos para inhibir funciones de los neutrófilos, sin inhibir sustancialmente la fagocitosis de bacterias. Funciones de los neutrófilos adecuadas para la inhibición de acuerdo con el método incluyen cualquier función que sea mediada por la actividad o expresión de PI3Kδ. Dichas funciones incluyen, sin limitación, liberación de superóxido estimulada, exocitosis o desgranulación estimulada, migración quimiotáctica, adhesión al endotelio vascular (por ejemplo, inmovilización/balanceo de neutrófilos, activación de la actividad de los neutrófilos, y/o retención de los neutrófilos al endotelio), diapédesis transmural o emigración a través del endotelio para los tejidos periféricos. En general, estas funciones pueden denominarse colectivamente "funciones inflamatorias", ya que se

relacionan generalmente con la respuesta de los neutrófilos a la inflamación. Las funciones inflamatorias de los neutrófilos se pueden distinguir de las funciones de destrucción bacteriana exhibidas por estas células, por ejemplo, fagocitosis y destrucción de bacterias. Por consiguiente, la invención incluye además métodos de tratamiento de estados de enfermedad en los que una o más de las funciones inflamatorias de los neutrófilos son anormales o indeseables.

Se ha establecido además, a través de la invención, que la PI3K δ juega un papel en la proliferación estimulada de linfocitos, incluyendo células B y células T. Por otra parte, la PI3K δ parece desempeñar un papel en la secreción estimulada de anticuerpos por las células B. Compuestos inhibidores de PI3K δ selectivos de la invención se han empleado para establecer que estos fenómenos pueden ser abrogados por la inhibición de PI3K δ . Por lo tanto, la divulgación incluye métodos para inhibir la proliferación de linfocitos, y métodos de inhibición de la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Otros métodos habilitados por la divulgación incluyen métodos de tratamiento de estados de enfermedad en los que una o más de estas funciones de los linfocitos son anormales o indeseables.

Se ha determinado ahora que la actividad de PI3K δ puede inhibirse selectivamente o específicamente para facilitar el tratamiento de una enfermedad mediada por PI3K δ mientras reduce o elimina complicaciones que normalmente están asociadas con la inhibición concomitante de la actividad de otras PI 3-quinasas de Clase I. Para ilustrar este aspecto, métodos de la divulgación pueden ser practicados utilizando miembros de una clase de compuestos que se han verificado que exhiben inhibición selectiva de PI3K δ en relación con otras isoformas de PI3K.

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

El término "alquilenilo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "alquilen 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", solo 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 sin sustituir o sustituido, por ejemplo, por 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 "aril-alquilo C₁₋₃" y "heteroaril-alquilo 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 sin sustituir 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 "hidroxilo" se define como -OH.

El término "alcoxi" se define como -OR, en el que R es alquilo.

El término "alcoxilalquilo" se define como un grupo alquilo en el que se ha sustituido un hidrógeno por un grupo alcoxi.

El término "(alquiltio)alquilo" se define de forma similar a un alcoxilalquilo, salvo por que hay presente un átomo de azufre, en lugar de un átomo de oxígeno.

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

El término "amino" se define como $-NH_2$ y el término "alquilamino" se define como $-NR_2$, en el que al menos un R es alquilo y el segundo T es alquilo o hidrógeno.

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

El término "alquiltio" se define como $-SR$, en la que R es alquilo.

15 El término "alquilsulfinilo" se define como $R-SO_2$, en la que R es alquilo.

El término "amino" se define como $-NH_2$ y el término "alquilamino" se define como $-NR_2$, en la que al menos un R es alquilo y el segundo T es alquilo o hidrógeno.

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

El término "alquiltio" se define como $-SR$, en la que R es alquilo.

El término "alquilsulfinilo" se define como $R-SO_2$, en la que R es alquilo.

25 El término "alquilsulfonilo" se define como $R-SO_3$, en la que R es alquilo.

El término "nitro" se define como $-NO_2$.

30 El término "trifluorometilo" se define como $-CF_3$.

El término "trifluorometoxi" se define como $-OCF_3$.

El término "ciano" se define como $-CN$.

35 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.

50 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.

60 En la siguiente explicación de la invención, cualquier compuesto mencionado que no entren dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente como referencia para una mejor comprensión de la persona experta de la invención.

65

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.

Por consiguiente, la invención proporciona métodos para caracterizar la potencia de un compuesto de ensayo como un inhibidor de polipéptido de PI3Kδ, dicho método que comprende las etapas de (a) medir la actividad de un polipéptido de PI3Kδ en presencia de un dicho compuesto de ensayo; (b) comparar la actividad del polipéptido de PI3Kδ en presencia del compuesto de ensayo con la actividad del polipéptido de PI3Kδ en presencia de una cantidad equivalente de un compuesto de referencia (por ejemplo, un compuesto inhibidor de PI3Kδ de la invención como se describe en el presente documento), en el que una actividad inferior del polipéptido de PI3Kδ en presencia del compuesto de ensayo que en presencia de la referencia indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor más potente que el compuesto de referencia, y una actividad superior del polipéptido de PI3Kδ en presencia del compuesto de ensayo que en presencia de la referencia indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor menos potente que el compuesto de referencia.

La invención proporciona además métodos para caracterizar la potencia de un compuesto de ensayo como un inhibidor de polipéptido de PI3Kδ, que comprende las etapas de (a) determinar una cantidad de un compuesto de control (por ejemplo, un compuesto inhibidor de PI3Kδ de la invención como se describe en el presente documento) que inhibe una actividad de un polipéptido de PI3Kδ en un porcentaje de referencia de inhibición, definiendo así una cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de control; (b) determinar una cantidad de un compuesto de ensayo que inhibe una actividad de un polipéptido de PI3Kδ en un porcentaje de inhibición de referencia, definiendo así una cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de ensayo; (c) comparar la cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de ensayo con la cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de control, en el que una cantidad inhibidora de referencia inferior para el compuesto de ensayo que para el compuesto de control indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor más potente que el compuesto de control, y una cantidad inhibidora de referencia superior para el compuesto de ensayo que para el compuesto de control indica que el compuesto de ensayo es un inhibidor menos potente que el compuesto de control. En un aspecto, el método utiliza una cantidad inhibidora de referencia que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido de PI3Kδ por 50 %, 60 %, 70 % o 80 %. En otro aspecto el método emplea una cantidad inhibidora de referencia que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido de PI3Kδ por 90 %, 95 % o 99 %. Estos métodos comprenden la determinación de la cantidad inhibidora de referencia de los compuestos en un ensayo bioquímico *in vitro*, en un ensayo basado en células *in vitro* o en un ensayo *in vivo*.

La invención proporciona además métodos para identificar un regulador negativo de la actividad de PI3Kδ, que comprende las etapas de (i) medir la actividad de un polipéptido de PI3Kδ en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo, y (ii) identificar como un regulador negativo un compuesto de ensayo que disminuye la actividad de PI3Kδ y que compete con un compuesto de la invención para la unión a PI3Kδ. Además, la invención proporciona métodos para identificar compuestos que inhiben la actividad de PI3Kδ, que comprenden las etapas de (i) poner en contacto un

polipéptido de PI3Kδ con un compuesto de la invención en la presencia y ausencia de un compuesto de ensayo, y (ii) identificar un compuesto de ensayo como un regulador negativo de la actividad PI3Kδ en el que el compuesto compite con un compuesto de la invención para la unión a PI3Kδ. Por consiguiente, la invención proporciona un método para la detección de reguladores negativos candidatos de la actividad de PI3Kδ y/o para confirmar el modo de acción de tales reguladores negativos candidatos. Tales métodos pueden emplearse contra otras isoformas de PI3K en paralelo para establecer la actividad comparativa del compuesto de ensayo a través de las isoformas y/o en relación a un compuesto de la invención.

En estos métodos, el polipéptido de PI3Kδ puede ser un fragmento de p110δ que exhibe actividad de quinasa, es decir, un fragmento que comprende el sitio catalítico de p110δ. Alternativamente, el polipéptido de PI3Kδ puede ser un fragmento del dominio de unión a p110δ de p85 y proporciona un método para identificar moduladores alostéricos de PI3Kδ. Los métodos pueden emplearse en células que expresan PI3Kδ o sus subunidades, ya sea de forma endógena o exógena. Por consiguiente, el polipéptido empleado en tales métodos puede ser libre en solución, fijado a un soporte sólido, modificado para que sea exhibido en una superficie celular o situado intracelularmente. La modulación de la actividad o la formación de complejos de unión entre el polipéptido de PI3Kδ y el agente que se está ensayando, puede a continuación, medirse.

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

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.

5 Los métodos de la divulgación 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.

15 En un aspecto, el método de la divulgación se puede emplear para tratar sujetos terapéutica o profilácticamente que padezcan o pueden padecer un trastorno inflamatorio. Un aspecto de la presente invención 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 transmigración 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.

20 "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.

25 "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 reperfusión, tras un ictus o infarto de miocardio, como respuesta inmunológica a un antígeno extraño y respuestas autoinmunitarias. Por consiguiente, los trastornos inflamatorios susceptibles a la invención abarcan trastornos asociados con reacciones del sistema de defensa específico así como con reacciones del sistema de defensa no específico.

35 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.

40 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 reperfusión, 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.

50 "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.

60 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, prostanooides o aminas 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 α), 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 α 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 α 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 divulgación permite 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 eosinofílico; 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, pleuresia, 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 (EIIc), 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.

El método puede 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 vasoespasmos 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 periodo. 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 cardíaco, particularmente los daños resultantes de la isquemia cardíaca 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 aspectos adicionales, la divulgación 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 el método de la divulgación incluyen, sin limitaciones, linfomas, por ejemplo neoplasias malignas de tejidos linfoides y reticuloendoteliales, tales como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkins, linfomas 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.

5 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.

20 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).

25 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.

35 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:

- 40 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 arábiga 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;
- 45 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
- 50 h) otros ingredientes, como conservantes, estabilizantes, agentes expansores, agentes emulsionantes, promotores de la solución, sales para la regulación de la presión osmótica y tampones.

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.

60 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.

65 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).

5 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.

10 Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no están limitadas a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, 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, sin limitación, 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.

20 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, así como profármacos, de los mismos.

25 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, pero no están limitadas a, cationes basados en metales alcalinos o en metales alcalinotérreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y de aluminio y similares, y cationes de amonio cuaternario no tóxico y de aminas, incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, dietilamonio, trietilamonio y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición básicas incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares.

35 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.

40 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.

Métodos de administración de los inhibidores de la actividad de PI3K δ

50 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®.

65 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 reperusión 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.

5 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.

10 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.

20 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 una gran afinidad por la hidroxiapatita, que es un componente principal del hueso. Esto se puede realizar, por ejemplo, adoptando 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)).

25 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.

30 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.

35 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.

45 Para los métodos de la divulgación, 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.

50 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 α : 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.

p110 β : Un clon de p110 β (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' (SEQ ID NO:3)

Cebador en 3':

5'-GATCGCGGCCGCTTAAGATCTGTAGTCTTCCGAAGTGTG-3' (SEQ ID NO:4)

El cebador en 5' se creó para contener una marca FLAG[®] en el mismo marco de lectura que la secuencia p110 β . Tras la amplificación, la secuencia FLAG[®]-p110 β 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.

p110 γ : El ADNc de p110 γ (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' (SEQ ID NO:5)

Cebador en 3':

5'-CGCGGATCCTTAGGCTGAATGTTTCTCTCCTTGTTG-3' (SEQ ID NO:6)

Posteriormente se añadió una marca FLAG® al extremo 5' de la secuencia p110 γ y se clonó en los sitios *BamHI-SpeI* de pFastbac HTb (Life Technologies) utilizando técnicas de ADN recombinante estándar, con la secuencia FLAG®-110 γ en el mismo marco de lectura que la marca His del vector.

p85 α : 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 p110 α , p110 β , o p110 δ 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 p110 γ no se asocia con p85, las células Sf21 se infectaron con baculovirus recombinantes que expresan solamente p110 γ marcada con His. En un planteamiento alternativo, p101 se puede clonar en baculovirus, para permitir la coexpresión con su elemento de unión preferible p110 γ .

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 min. Los sobrenadantes también se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 min, seguido de una ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 min. 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, ditioneitol 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

Análisis de alta resolución (HTS) de PI3K δ 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 PI3K δ . PI3K δ cataliza una fototransferencia de γ -[³²P]ATP 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 radiactividad 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 -[³²P]ATP (NEN, Pittsburgh, PA), liposomas de PIP₂/PS 6 μ M (Avanti Polar Lipids, Inc., Atlanta, GA), en HEPES 20 mM, pH 7,4.

5 La reserva la enzima 3X para HTS contenía PI3K δ 1,8 nM, 150 μ g/ml de IgG de caballo (utilizada únicamente como estabilizador), MgCl₂ 15 mM, DTT 3 mM en HEPES 20 mM a pH 7,4.

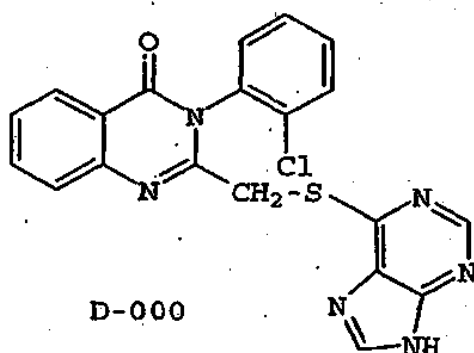
10 Las muestras del banco (conteniendo cada una un grupo de 22 compuestos) del análisis de alta resolución (HTS) químico en sulfóxido de dimetilo (DMSO) se diluyeron a 18,75 μ M o 37,8 μ M en agua bidestilada y se introdujeron 20 μ l de las diluciones en los pocillos de una placa de polipropileno de 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 %.

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

20 La placa de filtro de PVDF se aspiró a un vacío moderado (2-5 mmHg), se lavó con 5 x 200 μ l 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 μ l 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 Cl₅₀ para los inhibidores.

30 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 μ M para identificar qué compuestos presentaban la actividad deseada. De estos ensayos, se seleccionaron 73 compuestos y se analizaron para desarrollar curvas de Cl₅₀. A partir de los resultados de la curva de Cl₅₀, se seleccionaron 34 compuestos para los ensayos de selectividad contra PI3K α y PI3K β (véase el protocolo del ensayo en el Ejemplo 11).

35 A partir de los ensayos de selectividad, un compuesto, 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.



45 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-quinasas con una Cl₅₀ 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 Cl₅₀ 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 .

50 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 invención, 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 min a temperatura ambiente en una centrifuga 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 min 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 cartilago 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 min a 37 °C en una placa de 96 pocillos. Al finalizar el periodo de incubación, la placa se centrifugó durante 5 min 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, en el que 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 μM D-000.

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

5 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón de bicarbonato, pH 9,3) y se dejaron una noche a 4 °C. Después del lavado, se
10 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).

15 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 alicuotaron en los agujeros periféricos, mientras que el agujero central recibió fMLP (5 μM). Las placas se incubaron a 37 °C en presencia de 5 % de CO_2 durante cuatro horas, seguida de la germinación de la migración mediante la adición de una solución de glutaraldehído al 1 % en D-PBS. Después de retirar la capa de agarosa, los
20 pocillos se lavaron con agua destilada y se secaron.

El análisis de la migración de neutrófilos se realizó en una estación de trabajo de video 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
25 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 μM . Basado 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.
35

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
40 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 min. Las bacterias no internalizadas se eliminaron mediante 10 unidades/ml de lisostafina a 37 °C durante 5 min y la mezcla total se pasó a 37 °C. Se extrajeron muestras en varios momentos hasta 90 min 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.
50

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.
55

Ejemplo 4

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

60 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

65 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 min 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 min 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 min a 4-8 °C. Tras retirar el anticuerpo no unido, se mezcló PBL con perlas magnéticas recubiertas contra IgG de ratón (DynaL) durante 20 min 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 µl/pocillo) con 150 ng/ml de IgG antihumana de burro (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA), o 2 µg/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 µl/pocillo) y del bloqueo con suero de cabra al 3 % en PBST (100 µl/pocillo) durante una hora a temperatura ambiente, se añadieron muestras (100 µl/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 min, seguido de estreptavidina-HRP (1:20000) durante 30 min y, finalmente, a una solución de TMB (1:100) con H₂O₂ (1:10000) durante 5 min, 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 µM, frente a 7 µM 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. Basado 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 (DynaL) 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 PI3K 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 μ M D-000.

Ejemplo 6

10 Caracterización del papel de PI3K δ en la función de los osteoclastos

Para analizar el efecto del inhibidor de PI3K δ 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 macrófagos⁻¹ (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 μ g/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 μ g/ml) y los inhibidores de PI3K (1000 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 PI3K δ D-000 tuvo un efecto más pronunciado, dado que a 1000 nM este compuesto inhibió casi por completo la actividad del osteoclasto.

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

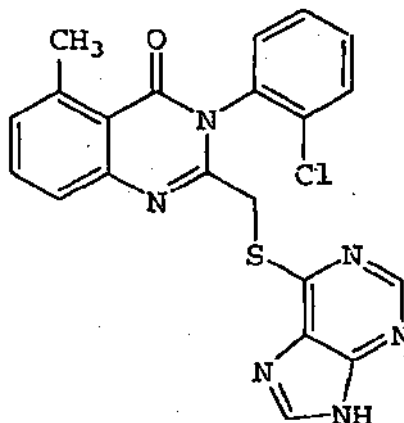
Ejemplo 7

30

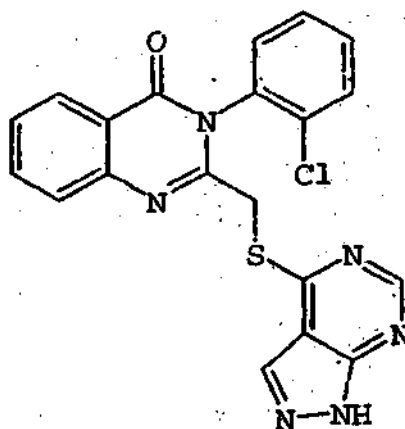
Caracterización del papel de PI3K δ en la función de los basófilos

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 min a 3,7 °C. Después, se añadió IgE policlonal antihumana de cabra (0,1 μ g/ml) o fMLP y se dejó incubando durante otros 30 min. La liberación de histamina en el sobrenadante se midió utilizando una técnica fluorométrica automatizada. Se analizaron dos compuestos, que se muestran a continuación.

40



D-026



D-999

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.

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.

Ejemplos de síntesis química

A continuación se recogen ejemplos 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 cualquiera 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 (etildietilaminopropilcarbodiimida), DIEA (diisopropiletilamina), 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 CHCl_3 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 K_2CO_3 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 SOCl_2 (5,5 ml, 76,1 mmol) en benceno (100 ml), seguido de 2-cloroanilina (6,7 ml, 63,5 mmol) y CHCl_3 (75 ml). El producto se lavó con NaHCO_3 (2 x 25 ml) acuoso y HCl (0,5 M, 75 ml) y se purificó mediante cromatografía en CH_2Cl_2 para proporcionar 4,3 g de una espuma marrón (55 %). RMN ^1H (CDCl_3) 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 SOCl_2 (7,0 ml, 95,9 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (7,3 ml, 69,3 mmol) y CHCl_3 (50 ml). El producto fue purificado mediante dos cromatografías en CH_2Cl_2 para proporcionar 1,48 g de un sólido naranja amarillento (20 %). RMN ^1H (CDCl_3) 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 (s a, 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 SOCl_2 (1,4 ml, 18,5 mmol) en benceno (25 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,6 ml, 14,8 mmol) y CHCl_3 (25 ml). El producto se sometió a cromatografía en CH_2Cl_2 y, a continuación, se trituró en hexanos para proporcionar 1,02 g de un sólido blanquecino (52 %). RMN ^1H (CDCl_3) 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, 1H); 6,45 (dd, J=2-4, 11 Hz, 1H); 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 SOCl_2 (2,2 ml, 29,2 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,72 g, 23,3 mmol) y CHCl_3 (50 ml). El producto se purificó mediante recrystalización en MeOH para proporcionar 1,72 g de un sólido amarillo oscuro (52 %). RMN ^1H (CDCl_3) 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 SOCl_2 (2,3 ml, 32,2 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (2,5 ml, 25,8 mmol) y CHCl_3 (50 ml). El producto se purificó mediante cromatografía en EtOAc/hexanos para proporcionar 2,06 g de un sólido naranja claro (60 %) RMN ^1H (CDCl_3) 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)

5 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,05 g de un sólido naranja amarillento (26 %). RMN 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)

15 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,19 g de un aceite marrón (51 %). RMN 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)

20 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 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)

30 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,16 g de un residuo ámbar oscuro espumoso (57 %). RMN 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+).

35

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

40 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 840 mg de un sólido amarillo oleaginoso (55 %). RMN 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 Hz, 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)

45 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,05 g de un sólido amarillo (34 %). RMN 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+).

50

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

55 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 sometió a cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 2,61 g de un aceite amarillo oscuro (81 %). RMN 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)

60 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 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+).

65

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

5 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 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⁺).

10 2-amino-N-(2-clorofenil)-4-nitrobenzamida (1o)

15 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 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⁺).

20 2-amino-N-(2-clorofenil)-4,5-hidroxibenzamida (1p)

25 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 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⁺).

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

30 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 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⁺).

35 2-amino-N-(2-clorofenil)-5-fluorobenzamida (1r)

40 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 CH₂Cl₂ para proporcionar 985 mg de un sólido amarillo mostaza (58 %). RMN 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).

45 Ejemplo 9**Preparación de los compuestos intermedios: Cloruros****2-clorometilo-3-(2-clorofenil)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolin-4-ona (2a)**

50 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 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⁺).

55 6-bromo-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2b)

60 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 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)

65 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 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+).

5 **6-cloro-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2d)**

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 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+).

10 **2-clorometil-3-(2-clorofenil)-5-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (2e)**

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 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+).

20 **5-cloro-2-clorometil-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2f)**

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 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+).

25 **2-clorometil-3-(2-clorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (2g)**

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 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+).

30 **8-cloro-2-clorometil-3-(2'-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona (2h)**

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 ¹H (CDCl₃) 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+).

35 **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 CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 1,44 g de un sólido blanquecino (61 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

40 **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 CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 340 mg de un sólido blanco (37 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

45 **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 CH₂Cl₂ para proporcionar 484 mg de un sólido rosa claro (40 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

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 CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 874 mg de un sólido amarillo claro (28 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

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 ¹H (CDCl₃) 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+).

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 CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 232 mg de un sólido marrón claro (39 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

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 K₂CO₃ acuoso seguido de dos cromatografías en CH₂Cl₂, para proporcionar 338 mg de un aceite amarillo (56 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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+).

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 MeOH/CH₂Cl₂, seguida de recristalización con isopropanol para proporcionar 523 mg del acetato en forma de cristales de color melocotón claro (57 %). RMN ¹H (CDCl₃) 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 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)

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 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+).

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

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 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+).

Ejemplo 10**Preparación de los compuestos inhibidores PI3Kδ****Compuesto D-001****<2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-clorofenil)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolin-4-ona**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2a (200 mg, 0,546 mmol), adenina (81 mg, 0,601 mmol), K₂CO₃ (83 mg, 0,601 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en etanol (EtOH)

para proporcionar 164 mg de un sólido de color beis (65 %), p.f. 281,5-282,7 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,76-7,81 (m, 1H); 7,70-7,76 (m, 1H); 7,60-7,67 (m, 2H); 7,45 (s, 1H); 7,22 (s, 2H); 6,90 (s, 1H); 5,08 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,91 (d, J = 17 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,87 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,9, 156,2, 155,4, 152,9, 150,0, 149,7, 149,4, 143,0, 141,9, 133,7, 132,1, 131,9, 131,2, 130,8, 129,3, 118,4, 113,6, 108,4, 105,8, 56,5, 56,1, 44,7. EM (ES): m/z 464,1 (M⁺). Anál. calc. para C₂₂H₁₈ClN₇O₃·0,1C₂H₆O·0,05KCl: C, 56,47; H, 3,97; Cl, 7,88; N, 20,76. Encontrado: C, 56,54; H, 4,05; Cl, 7,77; N, 20,55.

Compuesto D-002

10 2-(6-Aminopurin-o-ilmetil)-6-bromo-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2b (100 mg, 0,260 mmol), adenina (39 mg, 0,286 mmol), K₂CO₃ (40 mg, 0,286 mmol) y DMF (2 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 52 mg de un sólido de color blanquecino (41 %), p.f. 284,2-284,7 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,24 (d, J = 2,0 Hz, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,98 (dd, J = 1,9, 8,6 Hz, 1H); 7,74-7,83 (m, 2H); 7,59-7,68 (m, 2H); 7,46 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,22 (s, 2H); 5,12 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,94 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,5, 156,2, 152,9, 152,0, 150,1, 145,8, 141,8, 138,4, 133,1, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,1, 129,4, 128,9, 122,4, 120,4, 118,4, 45,0. EM (ES): m/z 482,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃ClBrN₇O·0,1KCl: C, 49,01; H, 2,67; Cl, 7,96; N, 20,00. Encontrado: C, 48,82; H, 2,82; Cl, 8,00; N, 19,79.

Compuesto D-003

25 2-(6-Aminopurin-o-ilmetil)-3-(2-clorofenil)-7-fluoro-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2c (100 mg, 0,310 mmol), adenina (46 mg, 0,340 mmol), K₂CO₃ (47 mg, 0,340 mmol) y DMF (1 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 57 mg de un sólido de color beis (44 %), p.f. 216,8-217,24 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,22 (dd, J = 6,3, 8,7 Hz, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,78-7,80 (m, 2H); 7,61-7,64 (m, 2H); 7,46 (dt, J = 2,1, 8,6 Hz, 1H); 7,32 (d, J = 9,8 Hz, 1H); 7,22 (s, 2H); 5,13 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,95 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 166,1 (d, J = 253 Hz), 159,6, 155,8, 152,5, 149,7, 148,6 (d, J = 14 Hz), 141,4, 132,8, 131,8, 131,6, 130,8, 130,5, 129,8 (d, J = 11 Hz), 129,0, 118,1, 117,4, 116,2 (d, J = 24 Hz), 112,7 (d, J = 22 Hz), 44,6. EM (ES): m/z 422,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃ClFN₇O·0,1H₂O(0,15KCl: C, 55,25; H, 3,06; Cl, 9,38; N, 22,55. Encontrado: C, 55,13; H, 2,92; Cl, 9,12; N, 22,30.

Compuesto D-004

35 2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-6-cloro-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona.

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2d (100 mg, 0,294 mmol), adenina (44 mg, 0,323 mmol), K₂CO₃ (45 mg, 0,323 mmol) y DMF (1 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 50 mg de un sólido de color amarillo (39 %), p.f. 294,5-294,84 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,10 (d, J = 2,2 Hz, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,86 (dd, J = 2,4, 8,8 Hz, 1H); 7,75-7,82 (m, 2H); 7,59-7,67 (m, 2H); 7,53 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,22 (s a, 2H); 5,13 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,95 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,7, 156,2, 152,9, 151,9, 150,1, 145,5, 141,8, 135,7, 133,1, 132,3, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,0, 129,4, 125,9, 122,0, 118,4, 44,9. EM (ES): m/z 438,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O: C, 54,81; H, 2,99; N, 22,37. Encontrado: C, 54,72; H, 2,87; N, 22,18.

Compuesto D-005

50 2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-clorofenil)-5-fluoro-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2e (200 mg, 0,619 mmol), adenina (92 mg, 0,681 mmol), K₂CO₃ (94 mg, 0,680 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 168 mg de un sólido de color blanquecino (64 %), p.f. 159-172 °C (gradualmente descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,10 (s, 1H); 8,08 (s, 1H); 7,73-7,89 (m, 3H); 7,57-7,71 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 2H); 7,34 (d, J = 11 Hz, 1H); 7,30 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 5,14 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,94 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,8 (d, J = 264 Hz), 157,5 (d, J = 4,2 Hz), 155,8, 152,4, 152,4, 150,0, 148,7, 142,1, 136,4 (d, J = 11 Hz), 133,0, 132,2, 132,1, 131,2, 130,9, 129,4, 123,8 (d, J = 3,6 Hz), 118,4, 114,5 (d, J = 20 Hz), 110,2 (d, J = 6,0 Hz), 44,9. EM (ES): m/z 422,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃ClFN₇O: C, 56,95; H, 3,11; Cl, 8,40; N, 23,24. Encontrado: C, 54,62; H, 3,32; Cl, 9,40; N, 21,29.

Compuesto D-006

65 2-(6-Aminopurin-o-ilmetil)-5-cloro-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2f (300 mg, 0,883 mmol), adenina (131 mg, 0,972 mmol), K₂CO₃ (134 mg, 0,972 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en

MeOH/CH₂Cl₂ y se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 188 mg de un sólido cristalino de color naranja pálido (49 %), p.f. 245,7-246,0^o (empezó a condensarse a 220 °C). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,76-7,81 (m, 2H); 7,72 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,59-7,66 (m, 3H); 7,41 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,26 (s a, 2H); 5,11 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,93 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,5, 156,2; 152,9, 152,2, 150,1, 1,49,2, 141,8, 135,4, 133,3, 133,2, 132,1, 132,0, 131,2, 130,9, 130,4, 129,4, 127,3, 118,4, 117,7, 44,9. EM (ES): m/z 438,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O•0,1C₂H₆O•0,5H₂O: C, 54,67; H, 3,11; Cl, 15,98; N, 22,09. Encontrado: C, 54,35; H, 3,00; Cl, 15,82; N, 22,31.

Compuesto D-007

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-clorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2 g (250 mg, 0,783 mmol), adenina (116 mg, 0,862 mmol), K₂CO₃ (119 mg, 0,862 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 93 mg de un sólido de color amarillo pálido (28 %), p.f. 190,7-190,9 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1H); 7,76-7,79 (m, 1H); 7,71-7,74 (m, 1H); 7,59-7,67 (m, 1H); 7,34 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 7,28 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,24 (s a, 2H); 5,07 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,92 (d, J = 17 Hz, 1H); 2,73 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,1, 156,2, 152,8, 150,9, 150,1, 148,3, 141,9, 141,0, 134,6, 133,6, 132,2, 131,9, 131,3, 130,8, 130,3, 129,3, 125,9, 119,1, 118,4, 44,8, 22,8. EM (ES): m/z 418,1 (M⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₆ClN₇O•H₂O: C, 57,87; H, 4,16; Cl, 8,13; N, 22,49. Encontrado: C, 57,78; H, 3,99; Cl, 8,38; N, 22,32.

Compuesto D-008

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-8-cloro-3-(2-clorofenil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2 h (100 mg, 0,294 mmol), adenina (44 mg, 0,324 mmol), K₂CO₃ (45 mg, 0,324 mmol) y DMF (1 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 50 mg de un sólido de color amarillo pálido (39 %), p.f. 273,3-273,5 °C (descolorido). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,11 (dd, J = 1,3, 8,0 Hz, 1H); 8,08 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 8,00 (dd, J = 1,3, 7,8 Hz, 1H); 7,79-7,83 (m, 2H); 7,63-7,66 (m, 2H); 7,56 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,21 (s a, 2H); 5,17 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,97 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,2, 156,1, 152,8, 152,2, 150,2, 143,3, 142,0, 135,6, 133,1, 132,3, 131,9, 131,1, 131,0, 130,9, 129,4, 128,4, 126,0, 122,5, 118,4, 45,0. EM (ES): m/z 438,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O•0,1CH₄O•0,6H₂O(0,15KCl): C, 52,09; H, 3,18; N, 21,15. Encontrado: C, 51,85; H, 2,93; N, 21,01.

Compuesto D-009

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-bifenil-2-il-5-cloro-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C' usando el Intermedio 2i (400 mg, 1,05 mmol), adenina (155 mg, 1,15 mmol), K₂CO₃ (159 mg, 1,15 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 344 mg de un sólido de color blanco (68 %), p.f. 299,9-300,1 °C (descolorido). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,08 (s, 1H); 7,89 (s, 1H); 7,58-7,73 (m, 5H); 7,51 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,46 (d, J = 7,5 Hz, 2H); 7,27-7,41 (m, 3H); 7,14-7,27 (m, 3H); 5,14 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,82 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,6, 156,2, 152,8, 152,5, 150,0, 149,0, 141,7, 140,2, 137,7, 135,0, 133,3, 133,2, 131,8, 130,7, 130,1, 129,8, 129,5, 128,8, 128,6, 128,4, 127,1, 118,4, 117,6, 45,3. EM (ES): m/z 480,1 (M⁺). Anál. calc. para C₂₆H₁₈ClN₇O: C, 65,07; H, 3,78; Cl, 7,39; N, 20,43. Encontrado: C, 64,77; H, 3,75; Cl, 7,43; N, 20,35.

Compuesto D-010

5-Cloro-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2j (200 mg, 0,626 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (93 mg, 0,546 mmol), K₂CO₃ (95 mg, 0,689 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 125 mg de un sólido de color blanquecino (46 %), p.f. 213,9 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,53 (s a, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,78 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,63 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,59 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,49 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 7,24-7,41 (m, 3H); 4,32-4,45 (m, 2H); 2,14 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,9, 157,2, 154,2, 151,5, 149,7, 149,6, 143,5, 136,1, 135,9, 135,1, 133,2, 131,3, 130,3, 130,0, 129,9, 129,1, 127,6, 127,1, 117,8, 32,4, 17,5. EM (ES): m/z 438,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₅ClN₆OS: C, 58,00; H, 3,48; Cl, 8,15; N, 19,32; S, 7,37. Encontrado: C, 58,05; H, 3,38; Cl, 8,89; N, 18,38; S, 7,00.

Compuesto D-011

5-Cloro-3-(2-fluorofenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2k (210 mg, 0,650 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (122 mg, 0,715 mmol), K₂CO₃ (99 mg, 0,715 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a

cristalizar en EtOH para proporcionar 240 mg de un sólido de color blanquecino (84 %), p.f. 244,0 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,81 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 7,74 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,62 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,46-7,55 (m, 1H); 7,29-7,42 (m, 2H); 4,47-4,59 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,4, 157,3 (d, J = 249 Hz), 156,4, 153,8, 151,0, 149,1, 143,2, 135,0, 132,9, 131,8 (d, J = 8,0 Hz), 130,8, 129,9, 126,7, 125,3 (d, J = 3,5 Hz), 123,6 (d, J = 13 Hz), 117,0, 116,2 (d, J = 19 Hz), 31,7. EM (ES): m/z 439,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂ClFN₆OS: C, 54,74; H, 2,76; Cl, 8,08; N, 19,15; S, 7,31. Encontrado: C, 54,42; H, 2,88; Cl, 8,08; N, 18,87; S, 7,08.

Compuesto D-012

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-fluorofenil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2k (210 mg, 0,650 mmol), adenina (97 mg, 0,715 mmol), K₂CO₃ (99 mg, 0,715 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 137 mg de un sólido de color castaño 50 % p.f. 295,6-295,8 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,05 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,75 (t, J = 7,6 Hz, 1H); 7,74 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,62-7,69 (m, 1H); 7,61 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 7,47-7,55 (m, 1H); 7,48 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 7,41 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,24 (s a, 2H); 5,19 (d, J = 17 Hz, 1H); 5,03 (d, J = 17 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,7, 157,6 (d, J = 250 Hz), 156,2, 152,8, 152,4, 150,0; 149,2, 141,8, 135,4, 133,3, 132,5 (d, J = 8,0 Hz), 130,4, 127,3, 126,2 (d, J = 3,5 Hz), 123,1 (d, J = 14 Hz), 118,4, 117,6, 117,2 (d, J = 19 Hz), 45,1. EM (ES): m/z 422,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₆H₁₃ClFN₇O•0,05C₂H₆O: C, 56,92; H, 3,16; Cl, 8,36; N, 23,12. Encontrado: C, 56,79; H, 3,20; Cl, 8,46; N, 22,79.

Compuesto D-013

3-Bifenil-2-il-5-cloro-2-(9H-purin-6-ilsulfanil-metil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2i (400 mg, 1,05 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (196 mg, 1,15 mmol), K₂CO₃ (159 mg, 1,15 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en MeOH/CH₂Cl₂ y posteriormente se volvió a cristalizar a partir de EtOH para proporcionar 439 mg de un sólido cristalino de color amarillo pálido (84 %), p.f. 222,0-222,5 °C (desc.). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,55 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,73 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 7,64 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,50-7,59 (m, 4H); 7,41-7,48 (m, 1H); 7,25-7,38 (m, 5H); 4,41 (d, J = 16 Hz, 1H); 4,16 (d, J = 16 Hz, 1H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,2, 157,0, 153,7, 151,5, 149,7, 149,3, 143,5, 139,9, 137,8, 135,1, 134,1, 133,3, 131,5, 130,5, 130,3, 130,1, 129,1, 128,9, 128,4, 128,4, 126,9, 117,5, 32,3. EM (ES): m/z 497,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₆H₁₇ClN₆OS: C, 62,84; H, 3,45; Cl, 7,13; N, 16,91; S, 6,45. Encontrado: C, 62,60; H, 3,47; Cl, 7,15; N, 16,65; S, 6,41.

Compuesto D-014

5-Cloro-3-(2-metoxifenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 21 (250 mg, 0,746 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (140 mg, 0,821 mmol), K₂CO₃ (113 mg, 0,821 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 254 mg de un sólido de color blanquecino (76 %), p.f. 237,0 °C (dec; se decoloró a 154,6 °C). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,53 (s a, 1H); 8,52 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,78 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,64 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,59 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,48 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 7,42 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,15 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,03 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 4,45 (s, 2H); 3,76 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,9, 157,1, 154,8, 154,7, 151,5, 149,6, 143,6, 135,1, 133,2, 131,3, 130,4, 130,0, 127,0, 124,8, 121,2, 117,8, 112,7, 56,1, 32,0. EM (ES): m/z 451,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₅ClN₆O₂S•0,15C₂H₆O•0,05KCl: C, 55,43; H, 3,47; Cl, 8,07; N, 18,21; S, 6,95. Encontrado: C, 55,49; H, 3,68; Cl, 7,95; N, 17,82; S, 6,82.

Compuesto D-015

3-(2-Clorofenil)-5-fluoro-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2e (200 mg, 0,619 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (116 mg, 0,681 mmol), K₂CO₃ (94 mg, 0,681 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar a partir de EtOH para proporcionar 152 mg de un sólido de color blanco (56 %), p.f. 222,7-223,8 °C (descolorido). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,89 (dt, J = 5,6, 8,1 Hz, 1H); 7,76 (dd, J = 1,6, 7,3 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 7,56 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,47 (t, J = 7,1 Hz, 1H); 7,41-7,53 (m, 2H); 7,37 (dd, J = 8,7, 11 Hz, 1H); 4,38-4,52 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,9 (d, J = 264 Hz), 157,6, 156,8, 154,1, 151,5, 149,6, 149,0, 143,6, 136,4 (d, J = 11 Hz), 133,9, 132,2, 131,7, 131,6, 130,5, 130,2, 128,8, 123,6, 114,4 (d, J = 20 Hz), 110,2, 32,0. EM (ES): m/z 439,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂ClFN₆OS•0,5C₂H₆O: C, 54,61; H, 3,27; Cl, 7,68; N, 18,19; S, 6,94. Encontrado: C, 54,37; H, 3,26; Cl, 7,89; N, 18,26; S, 6,55.

Compuesto D-016

3-(2-Clorofenil)-6,7-dimetoxi-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2a (200 mg, 0,546 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (102 mg, 0,601 mmol), K₂CO₃ (83 mg, 0,601 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 172 mg de un sólido de color blanquecino (65 %), p.f. 160-180 °C (descompuesto gradualmente). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,55 (s a, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,72 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 7,66 (d, J = 6,9 Hz, 1H) 7,38-7,54 (m, 3H); 7,22 (s, 1H); 4,36-4,52 (m, 2H); 3,94 (s, 3H); 3,89 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,1, 155,4, 151,5, 151,1, 149,4, 143,2, 134,6, 132,3, 131,6, 131,5, 130,4, 128,7, 113,6, 108,4, 105,8, 56,5, 56,1, 32,0. EM (ES): m/z 481,1 (M⁺). Anál. calc. para C₂₂H₁₇ClN₆O₃S•0,5C₂H₆O•0,05KCl: C, 54,41; H, 3,97; Cl 7,33; N, 16,55; S, 6,32. Encontrado: C, 54,43; H, 3,94; Cl, 7,69; N, 16,69; S, 6,52.

Compuesto D-017**6-Bromo-3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2b (200 mg, 0,519 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (97 mg, 0,570 mmol), K₂CO₃ (79 mg, 0,572 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 123 mg de un sólido de color blanquecino (47 %), p.f. 212-242 °C (descompuesto gradualmente). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,07 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,24 (d, J = 2,3 Hz, 1H); 8,06 (dd, J = 2,3, 8,7 Hz, 1H); 7,76 (dd, J = 1,9, 7,4 Hz, 1H); 7,70 (d, J = 8,7 Hz, 1H); 7,66 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,51 (dd, J = 2,1,7,9 Hz, 1H); 7,46 (dd, J = 1,9, 7,9 Hz, 1H); 4,47 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,7, 156,8, 153,6, 151,5, 146,1, 143,6, 138,5, 134,0, 132,1, 131,8, 131,5, 130,5, 130,2, 129,9, 128,9, 128,8, 122,2, 120,3, 32,0. EM (ES): m/z 499,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂ClBrN₆OS•0,2C₂H₆O•0,05KCl: C, 47,79; H, 2,59; N, 16,39; S, 6,25. Encontrado: C, 47,56; H, 2,54; N, 16,25; S, 6,58.

Compuesto D-018**3-(2-Clorofenil)-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-trifluorometil-3H-quinazolin-4-ona**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2m (200 mg, 0,536 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (100 mg, 0,588 mmol), K₂CO₃ (82 mg, 0,593 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 148 mg de un sólido de color blanco (56 %), p.f. 218,5-219,4 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,52 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,43 (d, J = 6,0 Hz, 1H); 8,26 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,84 (dd, J = 2,5, 6,7 Hz, 1H); 7,70-7,75 (m, 2H); 7,51-7,59 (m, 2H); 4,40-4,55 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,0, 157,2, 154,2, 151,4, 149,6, 144,4, 143,4, 133,8, 133,0 (c, J = 5,1 Hz), 132,0, 131,9, 131,6, 131,4, 130,6, 129,0, 127,3, 125,2 (c, J = 30 Hz), 123,6 (c, J = 273 Hz), 121,8, 32,6. EM (ES): m/z 489,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₂ClF₃N₆OS: C, 51,59; H, 2,47; Cl, 7,25; N, 17,19; S, 6,56. Encontrado: C, 51,51; H, 2,55; Cl, 7,37; N, 17,05; S, 6,38.

Compuesto D-019**3-(2-Clorofenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-benzo[g]quinazolin-4-ona**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2n (200 mg, 0,563 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (105 mg, 0,619 mmol), K₂CO₃ (86 mg, 0,619 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 128 mg de un sólido de color amarillo oscuro (48 %), p.f. 247,8-254,4 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,90 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,34 (s, 1H); 8,27 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 8,16 (d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,81 (dd, J = 1,6, 7,3 Hz, 1H); 7,70 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 7,61-7,74 (m, 2H); 7,49 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 7,44-7,53 (m, 1H); 4,44-4,56 (m, 2H) RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,3, 151,6, 151,5, 143,9, 142,2, 136,7, 134,4, 132,5, 131,8, 131,6, 130,5, 129,7, 129,3, 128,8, 128,6, 128,3, 128,3, 127,1, 125,2, 119,5, 32,4. EM (ES): m/z 471,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₄H₁₅ClN₆OS•0,2C₂H₆O•0,05KCl: C, 60,57; H, 3,37; Cl, 7,69; N, 17,37; S, 6,63. Encontrado: C, 60,24; H, 3,46; Cl, 7,50; N, 17,34; S, 6,69.

Compuesto D-020**6-Cloro-3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2d (200 mg, 0,587 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (110 mg, 0,646 mmol), K₂CO₃ (90 mg, 0,651 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 113 mg de un sólido cristalino de color amarillo (42 %), p.f. 237,1-238,2 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,55 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 7,94 (d, J = 8,3 Hz, 1H); 7,78 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 7,66 (d, J = 6,7 Hz, 1H); 7,48-7,56 (m, 2H); 4,48 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,8, 156,8, 153,5, 151,5, 149,6, 145,8, 143,6, 135,7, 134,0, 132,2, 132,1, 131,7, 131,5, 130,5, 130,2, 129,8, 128,8, 125,8, 121,9, 32,0. EM (ES): m/z 455,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂Cl₂N₆OS•0,1C₂H₆O•0,6H₂O (0,15KCl): C, 50,34; H, 2,89; Cl, 15,82; N, 17,44; S, 6,65. Encontrado: C, 50,02; H, 2,63; Cl, 15,51; N, 17,39; S, 6,81.

Compuesto D-021

8-Cloro-3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2 h (200 mg, 0,589 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (124 mg, 0,726 mmol), K₂CO₃ (100 mg, 0,726 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 202 mg de un sólido de color blanco (75 %), p.f. 211,9-212,7^o (descompuesto).

5 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,54 (s a, 1H); 8,47 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,12 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 8,07 (d, J = 7,6 Hz, 1H); 7,78 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 7,1 Hz, 1H); 7,58 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,42-7,54 (m, 2H); 4,52 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,3, 156,9, 153,9, 151,5, 149,7, 143,5, 135,7, 134,0, 132,1, 131,8, 131,4, 131,1, 130,5, 130,3, 128,9, 128,3, 126,1, 122,4, 32,5. EM (ES): m/z 455,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂Cl₂N₆OS: C, 52,76; H, 2,66; Cl, 15,57; N, 18,46; S, 7,04. Encontrado: C, 52,65; H, 2,79; Cl, 15,32; N, 18,47; S, 7,18.

10

Compuesto D-022**3-(2-Clorofenil)-7-fluoro-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

15 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2c (200 mg, 0,619 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (116 mg, 0,681 mmol), K₂CO₃ (95 mg, 0,687 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 143 mg de un sólido cristalino de color blanco (53 %), p.f. 151,4-154,2 °C (descolorido).

20 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,55 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,23 (dd, J = 6,3, 8,7 Hz, 1H); 7,77 (dd, J = 1,7, 7,4 Hz, 1H); 7,64 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 7,57 (d, J = 9,8 Hz, 1H); 7,45-7,52 (m, 3H); 4,48 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 169,0 (d, J = 253 Hz), 162,6, 159,3, 157,0, 154,0, 152,2, 151,7 (d, J = 13 Hz), 146,1, 136,5, 134,7, 134,2, 134,0, 133,0, 132,6 (d, J = 11 Hz), 131,3, 120,2, 118,9 (d, J = 24 Hz), 115,3 (d, J = 22 Hz), 34,6. EM (ES): m/z 439,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂ClFN₆OS•0,4- C₂H₆O•0,4H₂O(0,15KCl): C, 52,52; H, 3,22; Cl, 8,57; N, 17,67. Encontrado: C, 52,25; H, 3,11; Cl, 8,20; N, 17,69.

Compuesto D-023**3-(2-Clorofenil)-7-nitro-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

30 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 20 (216 mg, 0,617 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (116 mg, 0,681 mmol), K₂CO₃ (94 mg, 0,680 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 212 mg de un sólido cristalino de color amarillo (74 %), p.f. 218,0-218,3 °C (descompuesto).

35 RMN ¹H (DMSO- d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 8,38-8,45 (m, 2H) 8,31 (d, J = 8,4 Hz, 1H); 7,81 (d, J = 6,5 Hz, 1H); 7,68 (d, J = 6,7 Hz, 1H); 7,43-7,58 (m, 2H); 4,53 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 157,7, 154,4; 153,3, 149,8, 149,3, 147,6, 145,2, 141,4, 131,5, 129,8, 129,7, 129,2, 128,4, 127,1, 126,7, 122,7, 120,3, 119,4, 29,9. EM (ES): m/z 466,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₆H₁₂ClN₇O₃S•0,4C₂H₆O•0,05KCl: C, 51,19; H, 2,97; Cl, 7,63; N, 20,09; S, 6,57. Encontrado: C, 51,27; H, 2,88; Cl, 7,40; N, 20,04; S, 6,52.

Compuesto D-024**3-(2-Clorofenil)-6-hidroxi-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

40 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2p (200 mg, 0,552 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (117 mg, 0,685 mmol), K₂CO₃ (95 mg, 0,687 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 182 mg de un sólido de color blanco, una mezcla del producto deseado y el derivado de acetilo. Una porción de este material (120 mg) se suspendió en una mezcla de MeOH (2 ml) y NaHCO₃ acuoso (sat., 1 ml) y se agitó rápidamente durante 4 horas. La mezcla se concentró al vacío, se suspendió en H₂O (10 ml) y se almacenó a 4 °C durante una noche. El sólido de color blanco se recogió y se secó a 103 mg (66 %), p.f. 186-214 °C (descompuesto gradualmente).

45 RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,48 (s, 1H); 8,45 (s, 1H); 7,71 (d, J = 6,8 Hz, 1H); 7,62-7,64 (m, 2H); 7,43-7,51 (m, 2H); 7,40-7,43 (m, 1H); 7,35 (d, J = 8,8 Hz, 1H); 4,39-4,52 (m, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,6, 157,1, 156,6, 151,4, 150,8, 149,3, 144,1, 140,2, 134,5, 132,2, 131,6, 131,4, 130,4, 129,3, 128,7, 124,8, 121,7, 109,3, 32,0. EM (ES): m/z 437,0 (M⁺). Anál. calc. para (2 C₂₀H₁₃ClN₆O₂S•0,1C₂H₆O.6H₂O: C, 49,68; H, 3,88; Cl, 7,26; N, 17,21; S, 6,57. Encontrado: C, 49,43; H, 3,62; Cl, 7,32; N, 17,07; S, 6,58.

Compuesto D-025**5-Cloro-3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

60 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2f (300 mg, 0,883 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (165 mg, 0,972 mmol), K₂CO₃ (134 mg, 0,972 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 341 mg de un sólido cristalino de color naranja pálido (85 %), p.f. 233,7-234,4 °C (descompuesto).

65 RMN ¹H (DMSO- d₆) δ: 13,58 (s a, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,77-7,85 (m, 2H); 7,68 (d, J = 8,1 Hz, 2H); 7,65 (d, J = 7,7 Hz, 1H); 7,41-7,56 (m, 2H); 4,45 (d, J = 1,2 Hz, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,7, 156,8, 153,8, 151,5, 149,6, 149,5, 143,5, 135,4, 134,1, 133,3, 132,2, 131,6, 131,6, 130,5, 130,2, 128,8, 127,1, 117,6, 32,0. EM (ES): m/z 455,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂Cl₂N₆-OS•C₂H₆O•0,3H₂: C, 52,14; H, 3,70; Cl, 13,99; N, 16,58; S, 6,33. Encontrado: C, 52,07; H, 3,37; Cl, 13,40; N, 16,65; S, 6,42.

Compuesto D-026**3-(2-Clorofenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

5 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2 g (300 mg, 0,940 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (176 mg, 1,03 mmol), K₂CO₃ (142 mg, 1,03 mmol) y DMF (5 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 324 mg de un sólido cristalino de color blanco (79 %), p.f. 227,8-230,1 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,5,7 (s a, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,69-7,78 (m, 2H); 7,66 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 7,55 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,39-7,52 (m, 2H); 7,36 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 4,38-4,50 (m, 2H); 2,74 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,2, 156,3, 152,4, 151,5, 148,6, 143,9, 141,0, 134,6, 134,5, 132,3, 131,7, 131,4, 130,4, 130,2, 128,7, 125,7, 119,0, 32,0, 22,8. EM (ES): m/z: 435,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₁H₁₅ClN₆OS•0,65C₂H₆O•0,1H₂O: C, 57,40; H, 4,13; Cl, 7,60; N, 18,01; S, 6,87. Encontrado: C, 57,11; H, 3,96; Cl, 7,45; N, 17,79; S, 6,90.

Compuesto D-027**3-(2-Clorofenil)-6,7-difluoro-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

15 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2q (200 mg, 0,586 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (110 mg, 0,645 mmol), K₂CO₃ (89 mg, 0,645 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 143 mg de un sólido cristalino de color amarillo pálido (53 %), p.f. 207,8 °C (descolorido); se condensó a 136°C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,57 (s a, 1H); 8,49 (s, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,11 (t, J = 9,4 Hz, 1H); 7,88 (dd, J = 7,3, 11 Hz, 1H); 7,77 (dd, J = 1,7, 7,3 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 7,42-7,55 (m, 2H); 4,48 (s, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 159,5 (d, J = 2,5 Hz), 154,6 (dd, J = 14, 255 Hz), 154,0 (d, J = 1,5 Hz), 151,5, 149,3 (dd, J = 14, 250 Hz), 145,1 (d, J = 12 Hz), 143,9, 133,9, 132,1, 131,8, 131,4, 130,5, 128,9, 118,0 (d, J = 4,9 Hz), 115,8 (d, J = 18 Hz), 114,6 (d, J = 20 Hz), 32,0. MS (ES): m/z 457,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₁ClF₂N₆OS: C, 52,58; H, 2,43; Cl, 7,76; N, 18,40; S, 7,02. Encontrado: C, 51,81; H, 2,37; Cl, 7,49; N, 18,04; S, 7,55.

Compuesto D-028**3-(2-Clorofenil)-6-fluoro-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona**

30 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2r (118 mg, 0,365 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (68 mg, 0,402 mmol), K₂CO₃ (56 mg, 0,402 mmol) y DMF (2 ml). El producto en bruto se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 103 mg de un sólido cristalino de color blanquecino (64 %), p.f. 232,8-233,0 °C (descolorido). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,56 (s a, 1H); 8,48 (s, 1H); 8,44 (s, 1H); 7,81-7,86 (m, 3H); 7,76 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,67 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,40-7,54 (m, 2H); 4,48 (s a, 2H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 160,8 (d, J = 247 Hz), 160,2 (d, J = 3,3 Hz), 156,9, 152,3 (d, J = 1,9 Hz), 151,5, 149,7, 144,0, 143,6, 134,1, 132,1, 131,7, 131,5, 130,5, 130,4, 130,2, 128,8, 124,0 (d, J = 24 Hz), 122,0 (d, J = 8,7 Hz), 111,7 (d, J = 24 Hz), 32,0. EM (ES): m/z 439,0 (M⁺). Anál. calc. para C₂₀H₁₂ClFN₆OS•0,2C₂H₆O•0,1H₂O: C, 54,46; H, 3,00; Cl, 7,88; N, 18,68. Encontrado: C, 54,09; H, 2,73; Cl, 7,80; N, 18,77.

Compuesto D-029**2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-isopropilfenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona**

45 Se añadió cloruro de tionilo (2,2 ml, 30 mmol) a una solución en agitación de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (1,51 g, 10 mmol) en benceno (50 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. Una vez enfriada, el disolvente se retiró al vacío y se destiló dos veces con benceno (25 ml). El residuo se disolvió en CHCl₃ (50 ml) y se trató con 2-isopropilanilina (2,83 ml, 20 mmol). Después, la suspensión se calentó a reflujo durante 3 h. En ese momento la TLC (EtOAc al 50 %/hexano) indicó que la reacción se completó. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió encima de un tapón de 4 cm de gel de sílice y se enjuagó a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en HOAc (50 ml) y se trató con cloruro de cloroactilo (1,6 ml, 20 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y se concentró al vacío. El HOAc restante se retiró por destilación azeotrópica con tolueno (25 ml) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y se vertió a través de un tapón de 4 cm de gel de sílice, enjuagándose a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se identificaron por CLEM (EM (ES): m/z 327 (M⁺)), y se concentró al vacío para proporcionar 975 mg (30 %) en forma de una espuma de color blanco. El cloruro espumoso de color blanco (450 mg, 1,36 mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se trató con adenina (275 mg, 2,04 mmol) y K₂CO₃ (281 mg, 2,04 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, la suspensión se vertió en 200 ml de agua, se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, después se enfrió en el refrigerador durante 30 min. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío y se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 285 mg (49 %) de un sólido de color blanquecino. p.f. 258,0-258,2 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,19 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,45 (m, 2H), 7,23 (m, 3H), 5,11 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,71 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,73 (c, J = 6,9 Hz, 1H), 1,34 (d, J = 6,8 Hz, 3H), 1,13 (d, J = 6,8 Hz, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,9, 156,2, 152,8, 151,6, 150,1, 148,4, 146,1, 142,2, 140,8, 134,3, 133,7, 130,6, 130,0, 129,0, 127,7, 127,6, 125,8, 119,2, 118,4, 44,8, 28,3, 24,4, 23,3, 22,9. EM (ES): m/z 426,4 (M⁺). Anál. calc. para C₂₄H₂₃N₇O: C, 67,75; H, 5,45; N, 23,04. Encontrado:

C, 67,60; H, 5,45; N, 22,82.

Compuesto D-030

5 2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona

Se añadió cloruro de tionilo (2,2 ml, 30 mmol) a una solución en agitación de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (1,51 g, 10 mmol) en benceno (50 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. Una vez enfriada, el disolvente se retiró al vacío y se destiló dos veces con benceno (25 ml). al 50 % Después, la suspensión se calentó a reflujo durante 3 h. En ese momento la TLC (EtOAc al 50 %/hexano) indicó que la reacción se completó. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió encima de un tapón de 4 cm de gel de sílice y se enjuagó a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en HOAc (50 ml) y se trató con cloruro de cloroactilo (1,6 ml, 20 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y se concentró al vacío. El HOAc restante se retiró por destilación azeotrópica con tolueno (25 ml) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y se vertió a través de un tapón de 4 cm de gel de sílice, enjuagándose a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se identificaron por CLEM [EM us) : m/z 299 (M+)], se concentró al vacío para proporcionar 476 mg (16 %) en forma de una espuma de color blanco. El cloruro espumoso de color blanco (470 mg, 1,57 mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se trató con adenina (423 mg, 3,14 mmol) y K₂CO₃ (433 mg, 3,14 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, la suspensión se vertió en 200 ml de H₂O, se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, después se enfrió en el refrigerador durante 30 min. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío y se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 123 mg (20 %) de un sólido de color blanquecino. p.f. 281,5-282,7 °C (descompuesto). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,07 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,61 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,48 (m, 4H), 7,25 (m, 3H), 5,09 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,76 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,18 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,3; 156,2, 152,8, 151,4, 150,0, 148,5, 142,2, 140,9, 136,1, 135,4, 134,3, 131,7, 130,1, 130,0, 129,0, 128,0, 125,8, 119,2, 118,5, 44,8; 22,9, 17,4. EM (ES): m/z 398,2 (M+). Anál. calc. para C₂₂H₁₉N₇O: C, 66,49; H, 4,82; N, 24,67. Encontrado: C, 66,29; H, 4,78; N, 24,72.

Compuesto D-031

30 3-(2-Fluorofenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-il-sulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Se añadió cloruro de tionilo (2,2 ml, 30 mmol) a una solución en agitación de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (1,51 g, 10 mmol) en benceno (50 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. Una vez enfriada, el disolvente se retiró al vacío y se destiló dos veces con benceno: (25 ml). El residuo se disolvió en CHCl₃ (50 ml) y se trató con 2-fluoroanilina (1,93 ml, 20 mmol). Después, la suspensión se calentó a reflujo durante 3 h. En ese momento, la TLC (EtOAc al 50 %/hexano) indicó que la reacción se completó. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió encima de un tapón de 4 cm de gel de sílice y se enjuagó a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en HOAc (50 ml) y se trató con cloruro de cloroactilo (1,6 ml, 20 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y se concentró al vacío. El HOAc restante, se retiró por destilación azeotrópica con tolueno (25 ml) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y se vertió a través de un tapón de 4 cm de gel de sílice, enjuagándose a través de EtOAc al 20 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto se identificaron por CLEM [EM (ES): m/z 303 (M+)], y se concentró al vacío para proporcionar 1,12 g (37 %) en forma de una espuma de color blanco. El cloruro espumoso de color blanco (455 mg, 1,50. mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se trató con monohidrato de 6-mercaptopurina (510 mg, 3,0 mmol) y K₂CO₃ (414 mg, 3,0 mmol) y la mezcla se agitó durante una noche a temperatura ambiente. Después, la suspensión se vertió en 20,0 ml de agua, se agitó a temperatura ambiente durante 30 min, después se enfrió en el refrigerador durante 30 min. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío y se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 487 mg (77 %) de un sólido de color blanquecino. p.f. 151,9-152,2 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,48 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,70 (m, 2H), 7,48 (m, 2H), 7,33 (m, 3H), 4,55 (d, J = 15,1 Hz, 1H), 4,48 (d, J = 15,1 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 161,3, 157,8 (d, J = 249,1 Hz), 156,9, 152,8, 151,5, 149,6, 148,6, 143,6, 140,9, 134,7, 131,9 (d, J = 8,0 Hz), 131,4, 130,2, , 125,6 (d, J = 3,6 Hz), 125,5, 124,4 (d, J = 13,5 Hz), 118,8, 116,6 (d, J = 19,6 Hz), 56,4, 22,9. EM (ES): m/z 419,5 (M+). Anál. calc. para C₂₁H₁₅FN₆OS•0,15 C₂H₆O: C, 60,14; H, 3,77; F, 4,47; N, 19,76; S, 7,54. Encontrado: C, 59,89; H, 3,88; F, 4,42; N, 19,24; S, 7,23.

55 Compuesto D-032

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-5-cloro-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 2j (200 mg, 0,626 mmol), adenina (93 mg, 0,689 mmol), K₂CO₃ (95 mg, 0,689 mmol) y DMF (3 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 101 mg de un sólido de color blanquecino (39 %), p.f. 2,62,0-266,5 °C. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,08 (s, 1H); 8,07 (s, 1H); 7,70 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 7,58 (dd, J = 0,6, 7,9 Hz, 1H); 7,43-7,57 (m, 4H); 7,36 (dd, J = 0,7, 8,0 Hz, 1H); 7,26 (s a, 2H); 5,12 (d, J = 18 Hz, 1H); 4,78 (d, J = 18 Hz, 1H); 2,20 (s, 3H). RMN ¹³C (DMSO-d₆) ppm: 158,7, 156,2, 152,9, 152,7, 150,0, 149,4, 142,1, 136,1, 135,1, 135,0, 133,2, 131,8, 130,3, 130,1, 128,9, 128,1, 127,2, 118,5, 117,9, 44,9, 17,4. EM (ES): m/z 418,1 (M+). Anál. calc. para C₂₁H₁₆ClN₇O•0,1H₂O•0,05KCl: C, 59,57; H, 3,86; Cl, 8,79; N, 23,16. Encontrado: C, 59,65; H, 3,80; Cl, 8,70; N, 22,80.

Compuesto D-033**2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-metoxi-fenil)-3H-quinazolin-4-ona**

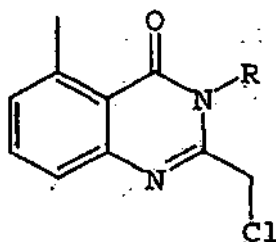
5 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 2l (250 mg, 0,746 mmol), adenina (111 mg, 0,821 mmol), K_2CO_3 (113 mg, 0,821 mmol) y DMF (4 ml). El producto en bruto se sometió a cromatografía en MeOH/ CH_2Cl_2 y se volvió a cristalizar en EtOH para proporcionar 124 mg de un sólido de color pardo (38 %), p.f. 257,0-257,1 °C. RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 8,06 (s, 1H); 8,01 (s, 1H); 7,71 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 7,57 (dd, J = 0,9, 7,9 Hz, 1H); 7,52-7,59 (m, 1H); 7,50 (dd, J = 1,6, 7,8 Hz, 1H); 7,38 (dd, J = 1,1, 8,2 Hz, 1H); 7,27 (dd, J = 0,6, 8,3 Hz, 1H); 7,24 (s a, 2H); 7,17 (dt, J = 0,9, 7,6 Hz, 1H); 5,07 (d, J = 17 Hz, 1H); 4,97 (d, J = 17 Hz, 1H); 3,79 (s, 3H). RMN ^{13}C (DMSO- d_6) ppm: 158,8, 156,2, 154,7, 153,2, 152,8, 150,1, 149,3, 142,0, 135,1, 133,2, 131,8, 130,1, 130,1, 127,2, 123,8, 121,6, 118,4, 117,9, 113,1, 56,2, 44,8. EM (ES): m/z 434,0 (M $^+$). Anál. calc. para $C_{21}H_{16}ClN_7O_2 \cdot 0,5H_2O \cdot 0,04KCl$: C, 56,57; H, 3,84; Cl, 8,27; N, 21,99. Encontrado: C, 56,29; H, 3,75; Cl, 8,21; N, 21,61.

15 Los siguientes compuestos se fabricaron generalmente de acuerdo con los métodos anteriormente descritos y sirven para ilustrar adicionalmente realizaciones específicas de los compuestos de la invención:

- 3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-034)
- 3-(2-isopropilfenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-035)
- 20 3-(2-metoxifenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-036)
- 3-bencil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-037)
- 3-butil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-038)
- 3-morfolin-4-il-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona, sal acetato (D-039)
- 3-(3-metoxifenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-040)
- 25 3-((3-clorofenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-041)
- 2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-piridin-4-il-3H-quinazolin-4-ona (D-042)
- 3-bencil-5-fluoro-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-043)
- 3-(4-metilpiperazin-1-il)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona, sal acetato (D-044)
- éster etílico del ácido [5-fluoro-4-oxo-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-4H-quinazolin-3-il]acético (D-045)
- 30 3-(2-metoxifenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-046)
- 3-(2-metoxifenil)-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-047)
- 2-(6-aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-fluorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-048)
- 2-(6-aminopurin-9-ilmetil)-3-bencil-5-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (D-049)
- 2-(6-aminopurin-9-ilmetil)-3-butil-3H-quinazolin-4-ona (D-050)
- 35 2-(6-aminopurin-9-ilmetil)-3-morppolin-4-il-3H-quinazolin-4-ona, sal acetato (D-051)
- 3-(4-clorofenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-052).

Los compuestos adicionales de la presente invención se prepararon por los siguientes procedimientos sintéticos.

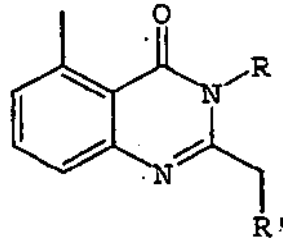
40 Los siguientes intermedios se prepararon por el Procedimiento A anteriormente descrito.



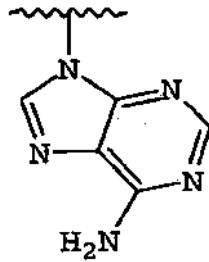
- 45 3a R= ciclopropilo
- 3b R= ciclopropilmetilo
- 3c R= fenetilo
- 3d R= cicloperitilo
- 3e R= 3-(2-cloro)piridilo
- 3f R= ácido 4-(2-metil)benzoico
- 50 3 g R= 4-nitrobencilo
- 3h R=ciclohexilo
- 3i R=E-(2-fenil)ciclopropilo

55 Los compuestos adicionales de la presente invención (D-053 a través de D-070) que tienen la siguiente estructura de núcleo se volvió a discutir en la siguiente Sección Experimental. Todos se prepararon siguiendo el Procedimiento C.

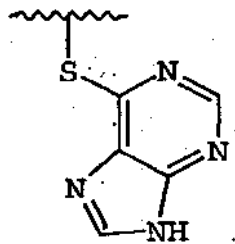
Estructura del núcleo:



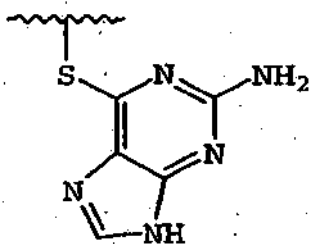
Compuesto n.º	R	R'
D-053	ciclopropilo	C
D-054	ciclopropilmetilo	B
D-055	ciclopropilmetilo	A
D-056	ciclopropilmetilo	C
D-057	fenetilo	B
D-058	fenetilo	C
D-059	ciclopentilo	B
D-060	ciclopentilo	A
D-061	3-(2-cloro)piridilo	B
D-062	3-(2-cloro)piridilo	A
D-063	ácido 4-(2-metil)benzoico	B
D-064	ciclopropilo	B
D-065	ciclopropilo	A
D-066	4-nitrobencilo	B
D-067	ciclohexilo.	B
D-068	ciclohexilo	A
D-069	ciclohexilo	C
D-070	E-(2-fenil)ciclopropilo	B



A



B.



C

2-(2-Amino-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-ciclopropil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-053)

5

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3a (100 mg, 0,4 mmol), 2-amino-6-mercapto purina (80 mg, 0,48 mmol) y K_2CO_3 (77 mg, 0,56 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O . RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 7,89 (d, J = 0,9 Hz, 1H); 7,54 (t, J = 7,4 Hz, 1H); 7,34 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,19 (d, J = 7,2 Hz, 1H); 6,28 (s, 2H); 4,94 (s, 2H); 2,70 (s, 3H); 1,24 (d, J = 6,5 Hz, 2H); 0,91 (s, 2H). EM (ES): m/z 380 (M+H), 190.

10

3-Ciclopropilmetil-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-054)

15

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3b (300 mg, 1,14 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (214 mg, 1,26 mmol) y K_2CO_3 (189 mg, 1,37 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O , seguido de recristalización en MeOH. RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 13,60 (s a, 1H); 8,72 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,28 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 5,01 (s, 2H); 4,11 (d, J = 6,8 Hz, 2H); 2,78 (s, 3H); 1,35 (quint, J = 6,2 Hz, 1H); 0,4-0,59 (m, 4H). EM (ES): m/z 3,79 (M+H), 325.

20

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-ciclopropilmetil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-055)

25

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3b 1300 mg, 1,14 mmol), adenina (170 mg, 1,26 mmol) y K_2CO_3 (189 mg, 1,37 mmol) El producto se purificó por trituración a partir de H_2O , seguido de recristalización en MeOH. RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 8,21 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); 7,52 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,18-7,31 (m, 3H); 7,06 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 5,6,8 (s, 2H); 4,14 (d, J = 6,8 Hz, 2H); 2,77 (s, 3H); 1,34 (quint, J = 6,4 Hz, 1H); 0,45-0,60 (m, 4H). EM (ES): m/z 362 (M+H), 308.

30

2-(2-Amino-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-ciclo-propilmetil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-056)

35

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3b (280 mg, 1,1 mmol), 2-amino-6-mercapto purina (200 mg, 1,2 mmol) y K_2CO_3 (180 mg, 1,3 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de MeOH. RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 12,70 (s a, 1H); 7,95 (s, 1H); 7,64 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,44 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,28 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 6,41 (s, 2H); 4,91 (s, 2H); 4,05 (d, J = 6,8 Hz, 2H); 2,78 (s, 3H); 1,26-1,43 (m, 1H); 0,36-0,56 (m, 4H). EM (ES): m/z 394 (M+H), 340.

40

5-Metil-3-fenetil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-057)

45

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3c (750 mg, 2,4 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (442 mg, 2,6 mmol) y K_2CO_3 (398 mg, 2,9 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O . RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 13,61 (s, 1H); 8,71 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,65 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,44 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,16-7,35 (m, 6H); 4,89 (s, 2H); 4,29 (t a, J = 7,9 Hz, 2H); 3,08 (t a, J = 7,8 Hz, 2H); 2,81 (s, 3H). EM (ES): m/z 429 (M+H), 105.

50

2-(2-Amino-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-fenetil-3H-quinazolin-4-ona (D-058)

55

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3c (750 mg, 2,4 mmol), 2-amino-6-mercapto purina (435 mg, 2,6 mmol) y K_2CO_3 (398 mg, 2,9 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O . RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 12,61 (s, 1H); 7,95 (s, 1H); 7,65 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,45 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,14-7,32 (m, 6H); 6,44 (s, 2H); 4,81 (s, 2H); 4,24 (t a, J = 7,9 Hz, 2H); 3,04 (t a, J = 7,8 Hz, 2H); 2,81 (s, 3H). EM (ES): m/z 444 (M+H), 340.

3-Ciclopentil-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-059)

60

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3d (100 mg, 0,36 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (73 mg, 0,43 mmol) y K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol). El producto se purificó por recristalización en MeOH. RMN 1H (DMSO- d_6) δ : 13,62 (s a, 1H); 8,77 (s, 1H); 8,48 (s, 1H); 7,62 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,42 (d, J = 7,8 Hz, 2H); 7,26 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 5,03 (s, 2H); 4,80 (quint, J = 8,0 Hz, 1H); 2,76 (s, 3H); 2,12-2,31 (m, 2H); 1,79-2,04 (m, 4H); 1,44-1,58 (m,

2H). EM (ES): m/z 393 (M+H), 325.

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-ciclopentil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-060)

5 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3d (100 mg, 0,36 mmol), adenina (58 mg, 0,43 mmol) y K₂CO₃ (100 mg, 0,72 mmol). El producto se purificó por recristalización en MeOH. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,15 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 7,52 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,16-7,31 (m, 3H); 7,10 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 5,68 (s, 2H); 4,78 (quint, J = 8,3 Hz, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09-2,32 (m, 2H); 1,86-2,04 (m, 2H); 1,68-1,86 (m, 2H); 1,43-1,67 (m, 2H). EM (ES): m/z 376 (M+H), 308, 154.

3-(2-Cloro-piridm-3-il)-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazoMn-4-ona (D-067)

10 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3e (500 mg, 1,6 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (289 mg, 1,7 mmol) y K₂CO₃, (262 mg, 1,9 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H₂O. EM (ES): m/z 436 (M+H), 200.

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-(2-cloro-piridm-3-il)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-062)

15 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3e (500 mg, 1,6 mmol), adenina (230 mg, 1,7 mmol) y K₂CO₃ (262 mg, 1,9 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H₂O. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,59 (dd, J = 1,7, 4,8 Hz, 1H); 8,22 (dd, J = 1,7, 7,8 Hz, 1H); 8,025 (s, 1H); 8,017 (s, 1H); 7,60-7,72 (m, 2H); 7,35 (t, J = 8,2 Hz, 2H); 7,22 (s, 2H); 5,12 (d, J = 17,0 Hz, 1H); 5,02 (d, J = 17,0 Hz, 1H); 2,72 (s, 3H). EM (ES): m/z 419 (M+H).

Ácido 3-metil-4-[5-metil-4-oxo-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-4H-quinazolin-3-il]-benzoico (D-063)

25 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3f (400 mg, 1,17 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (219 mg, 1,29 mmol) y K₂CO₃ (226 mg, 1,64 mmol). El producto se purificó por recristalización en MeOH. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,54 (s a, 1H); 8,44 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 7,80 (s, 2H); 7,71 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,59 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,52 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,34 (d, J = 7,4 Hz, 1H); 4,46 (d, J = 15,4 Hz, 1H); 4,34 (d, J = 15,7 Hz, 1H); 3,17 (d, J = 4,4 Hz, 1H); 2,73 (s, 3H); 2,17 (s, 3H). EM (ES): m/z 459 (M+H).

3-Ciclopropil-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-064)

30 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3a (100 mg, 0,40 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (90 mg, 0,53 mmol) y K₂CO₃, (97 mg, 0,7 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H₂O. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,69 (d, J = 0,8 Hz, 1H); 8,47 (s, 1H); 7,57 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,23 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 5,08 (s, 2H); 3,06-3,18 (m, 1H); 2,74 (s, 3H); 1,14-1,36 (m, 2H); 0,92-1,06 (m, 2H).

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-ciclopropil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-065)

40 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3a (100 mg, 0,40 mmol), adenina (94 mg, 0,7 mmol) y K₂CO₃ (121 mg, 0,88 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H₂O. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,19 (d, J = 0,9 Hz, 1H); 8,09 (d, J = 1,0 Hz, 1H); 7,48 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,13-7,29 (m, 3H); 7,04 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 5,74 (s, 2H); 3,00-3,13 (m, 1H); 2,73 (s, 3H); 1,18-1,38 (m, 2H); 0,94-1,09 (m, 2H).

5-Metil-3-(4-nitro-bencil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-066)

45 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3g (200 mg, 0,58 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (148 mg, 0,87 mmol) y K₂CO₃ (160 mg, 1,16 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de MeOH. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,44 (s a, 1H); 8,50 (s, 1H); 8,31 (s, 1H); 8,03 (d, J = 8,6 Hz, 2H); 7,58 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,37 (d, J = 8,3 Hz, 3H); 7,22 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 5,44 (s, 2H); 4,70 (s, 2H); 2,66 (s, 3H). EM (ES): m/z 460 (M+H).

3-Ciclohexil-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-067)

50 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3h (150 mg, 0,52 mmol), monohidrato de 6-mercapto purina (97 mg, 0,57 mmol) y K₂CO₃, (86 mg, 0,62 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de MeOH. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 13,66 (s a, 1H); 8,82 (s, 1H); 8,50 (s, 1H); 7,62 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,26 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 5,01 (s, 2H); 4,11 (s a, 1H); 2,75 (s, 3H); 2,38-2,65 (m, 2H); 1,58-1,90 (m, 4H); 1,37-1,57 (m, 1H); 0,71-1,26 (m, 3H). EM (ES): m/z 407 (M+H), 325.

2-(6-Aminopurin-9-ilmetil)-3-ciclohexil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-068)

60 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3h (150 mg, 0,52 mmol), adenina (77 mg, 0,57 mmol) y K₂CO₃ (86 mg, 0,62 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de MeOH. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 8,15 (s, 2H); 7,54 (t, J = 7,9 Hz, 1H); 7,06-7,35 (m, 4H); 5,65 (s, 2H); 4,09 (s a, 1H); 2,73 (s, 3H); 1,41-1,90 (m, 6H); 0,99-1,34 (m, 4H). EM (ES): m/z 390 (M+H), 308.

2-(2-Amino-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-ciclohexil-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (D-069)

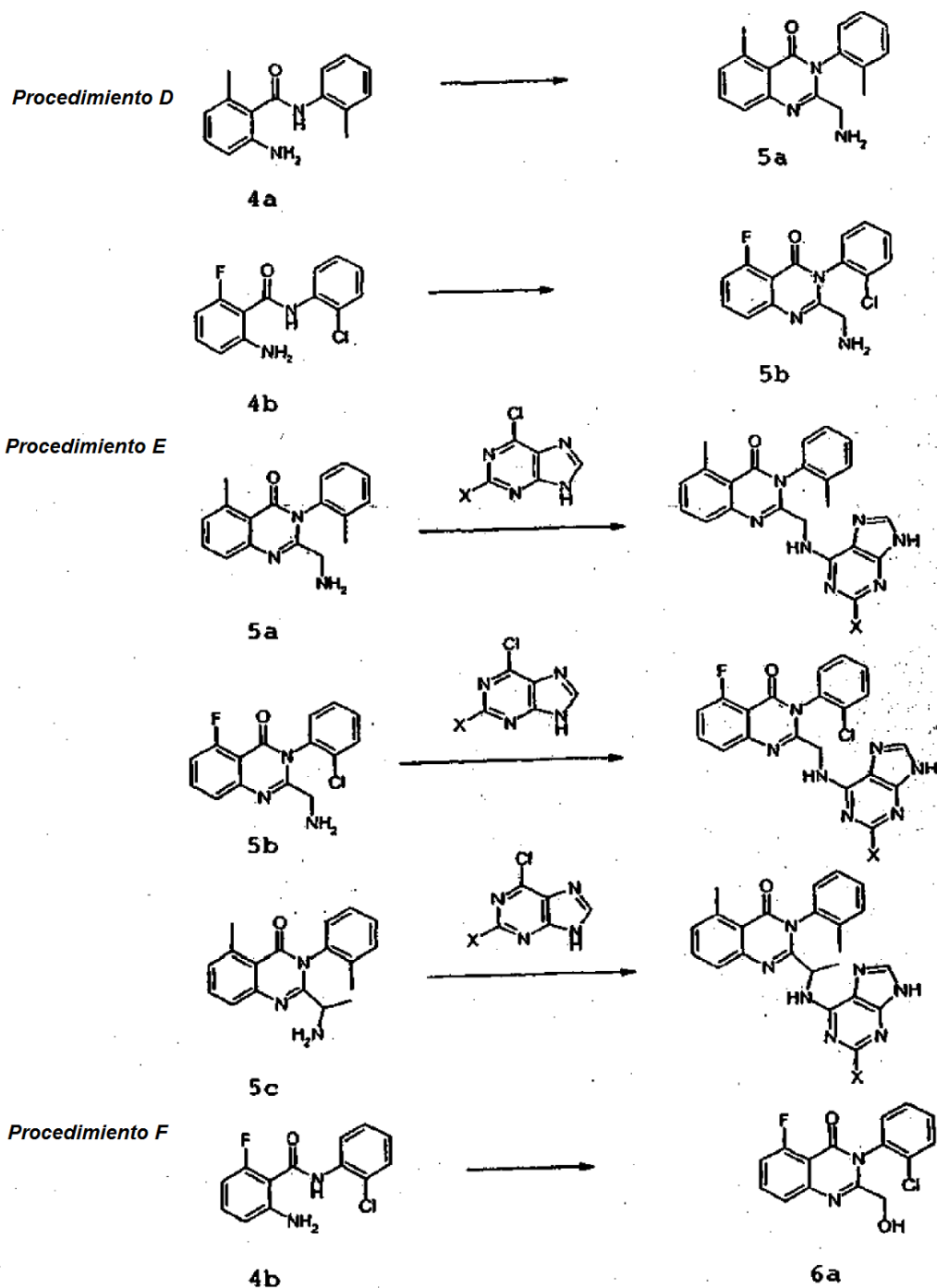
65

Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3 h (150 mg, 0,52 mmol), 2-amino-6-mercapto purina (95 mg, 0,57 mmol) y K₂CO₃ (86 mg, 0,62 mmol). El producto se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, 10-750 acetonitrilo/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a: 18 min, detector a 220). EM (ES): m/z 422 (M+H), 340, 170.

5-Metil-3-(E-2-fenil-ciclopropil)-2-(9H-purin-6-ilalufanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-070)

10 Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 3i y monohidrato de 6-mercapto purina). El producto se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220). EM (ES): m/z 441.

Los compuestos adicionales de la invención a continuación, junto con la ruta sintética a los compuestos D-071 a D-118.



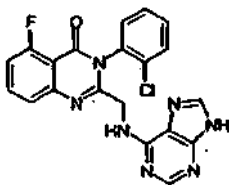
Procedimiento D: Una mezcla de amida 4a o 4b, Fmoc-cloruro de glicilo y ácido acético glacial se calentó a 120 °C durante de 1 a 4 horas. La mezcla resultante se concentró al vacío y se purificó por cromatografía ultrarrápida para proporcionar la amina cíclica protegida. Este material se combinó con 10 equivalentes de octanotiol y una cantidad catalítica de DBU en THF y se agitó a temp. ambiente hasta que el consumo del material de partida se indicó por CLEM. La reacción se vertió directamente en una columna ultrarrápida (equilibrada en CH₂Cl₂) y eluyendo con MeOH al 0-5 %/CH₂Cl₂, para proporcionar la mina libre, 5a o 5b. El compuesto 5c se preparó de una manera análoga usando (±) Fmoc-alanil-cloruro en lugar de Fmoc-cloruro de glicilo.

Procedimiento E: Cantidades equimoleculares de 5a o 5b, la 6-cloropurina apropiada y DIEA se combinaron con EtOH en un vial pequeño y se calentó a 80 °C. La reacción se controló de manera regular por CLEM y se purificó como se indica.

Procedimiento F: Una mezcla de amida 4b, cloruro de acetoxiacetil y ácido acético glacial se calentó a 120 °C y se

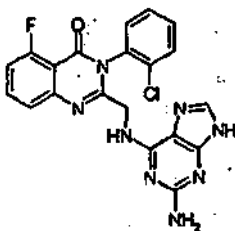
agitó durante 2 horas. La reacción enfriada se filtró y los sólidos se lavaron con CH_2Cl_2 para proporcionar el acetato cíclico en forma de un sólido de color blanco. Este material se combinó con K_2CO_3 en metanol acuoso y se agitó durante una hora, después se concentró al vacío. Los sólidos resultantes se trituraron a partir de para proporcionar 6a en forma de un sólido de color blanco.

5



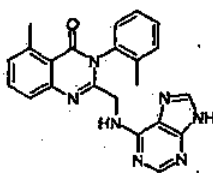
3-(2-Clorofenil)-5-fluoro-2-[(9H-purin-6-ilamino)-metil]-3H-quinazolin-4-ona (D-072)

- 10 Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5b (50 mg, 0,165 mmol) y 6-cloropurina (26 mg, 0,165 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 5 días, las reacciones se purificaron por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220 λ). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,99 (s a, 1H); 8,14 (s a, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,85 (dt, J = 5,7, 8,1 Hz., 1H); 7,68-7,79 (m, 3H); 7,57 (t, J = 6,2 Hz., 1H); 7,57 (d, J = 7,7 Hz., 1H); 7,50 (d, J = 8,1 Hz., 1H); 7,35 (dd, J = 8,4, 10,7 Hz., 1H); 4,15-4,55 (m, 2H). EM (ES): m/z 422 (M+H), 211.
- 15



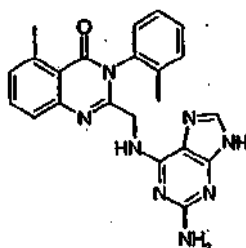
2-[(2-Amino-9H-purin-6-ilamino)metil]-3-(2-clorofenil)-5-fluoro-3H-quinazolin-4-ona (D-074)

- 20 Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5b (50 mg, 0,165 mmol) y 2-amino-6-cloropurina (28 mg, 0,165 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 5 días, la reacción se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220 λ). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,13 (s a, 1H); 7,86 (dt, J = 5,6, 8,2 Hz., 1H); 7,76-7,83 (m, 2H); 7,68 (s a, 1H); 7,61 (t, J = 5,7 Hz., 1H); 7,61 (d, J = 7,2 Hz., 1H); 7,53 (d, J = 8,2 Hz., 1H); 7,35 (dd, J = 8,2, 10,9 Hz., 1H); 5,66 (s a, 2 H); 4,16-4,50 (m, 1H); 4,09 (c, J = 5,3 Hz., 2H). EM (ES): m/z 437 (M+H), 219.
- 25



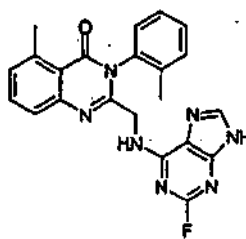
5-Metil-2-[(9H-purin-6-ilamino)metil]-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-071)

- 30 Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 6-cloropurina (11 mg, 0,072 mmol) y 5a (20 mg, 0,072 mmol). Después de 5 días, la reacción se interrumpió con agua y la suspensión resultante se filtró. Los sólidos se purificaron por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220 λ). RMN ^1H (DMSO- d_6) δ : 12,98 (s a, 1H); 8,14 (s a, 1H); 8,10 (s, 1H); 7,58-7,79 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 4H); 7,26-7,36 (m, 2H); 3,93-4,39 (m, 2H); 2,75 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). EM (ES): m/z 398 (M+H), 199.
- 35



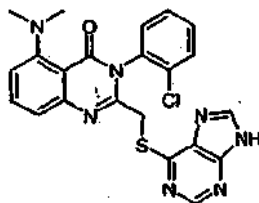
2-[(2-Amino-9H-purin-6-ylamino)methyl]-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-073)

- 5 Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5a (189 mg, 0,677 mmol) y 2-amino-6-cloropurina (115 mg, 0,677) en 3 ml de EtOH. Después de 3 días, la reacción se filtró para retirar el exceso de purina y el filtrado se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ) para proporcionar 7 mg del producto en forma de la sal TFA. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 8,88 (s a, 1H); 8,21 (s, 1H); 7,71 (t, J = 7,7 Hz., 1H); 7,45-7,56 (m, 2H); 7,38-7,44 (m, 3H); 7,35 (d, J = 7,5 Hz., 1H); 7,30 (s a, 1H); 4,40 (dd, J = 4,5, 17,5 Hz., 1H); 4,27 (dd, J = 5,3, 17,4 Hz., 1H); 2,75 (s, 3H); 2,09 (s, 3H). EM (ES): m/z 413 (M+H), 207, 163.



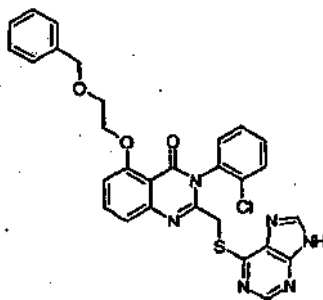
2-[(2-Fluoro-9H-purin-6-ylamino)methyl]-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-076)

- 15 Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5a (20 mg, 0,072 mmol) y 2-fluoro-6-cloropurina (16 mg, 0,094 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 18 horas, la reacción se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ) y posteriormente se volvió a cristalizar a partir de EtOH para proporcionar 14 mg del producto en forma de un sólido de color amarillo. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 13,12 (s a, 1H); 8,40 (s a, 1H); 8,15 (s, 1H); 7,66 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,35-7,49 (m, 4H); 7,31 (d, J = 7,2 Hz., 1H); 4,00-4,22 (m, 2H); 3,17 (s., 1H); 2,74 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). EM (ES): m/z 416 (M+H), 208.



25 **(2-Clorofenil)-dimetilamino-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-075)**

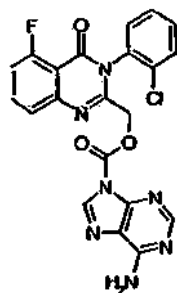
- 30 D-015 (100 mg, 0,228 mmol) se combinó con hidróxido de amonio (28-30 %, 1 ml) en DMF (2 ml) y se calentó a 80 °C. Después de 2 días, la reacción se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ) para proporcionar el producto en forma de un sólido de color amarillo, ~2 mg. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 13,52 (s a, 1H); 8,46 (s, 1H); 8,42 (s, 1H); 7,69 (dd, J = 2,1,7,3 Hz, 1H); 7,62 (dd, J = 1,6, 7,6 Hz., 1H); 7,61 (t, J = 8,0 Hz., 1H); 7,37-7,48 (m, 2H); 7,05 (d, J = 7,9 Hz., 1H); 6,96 (d, J = 7,8 Hz., 1H); 4,32-4,45 (m, 2H); 2,80 (s, 6H). EM (ES): m/z 464 (M+H), 232.



5-(2-Benciloxietoxi)-3-(2-clorofenil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-078)

5 A una solución de 2-benciloxietanol (0,3 ml) en DMF (1,0 ml) se le añadió NaH (50 mg, 2,08 mmol). Después de agitar durante 5 minutos, 0,5 ml se añadió a una solución de IC-87185 (50 mg, 0,114 mmol) en DMF anhidra (0,75 ml). La reacción se calentó a 50 °C y se agitó durante 3 días. La purificación por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220Å) proporcionó en forma de un sólido heterogéneo, 150 µg. EM (ES): m/z 571 (M+H), 481.

10

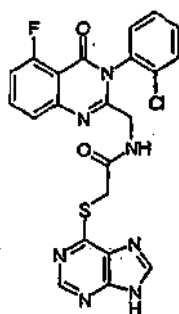


3-(2-Clorofenil)-5-fluoro-4-oxo-3,4-dihidro-quinazolin-2-ilmetil éster del ácido 6-aminopurin-9-carboxílico (D-079)

15

A una solución de 3b (20 mg, 0,066 mmol) en CH₂Cl₂ (500 µl) a 0 °C se le añadió fosgeno (2 M/tolueno, 36 µl, 0,072 mmol), seguido de adenina (10 mg, 0,072 mmol) y DIEA (25 µl, 0,145 mmol). La reacción se dejó alcanzar temperatura ambiente y se agitó durante 8 días. La purificación por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220Å) proporcionó el producto en forma de una mezcla. RMN ¹H (DMSO-d₆) δ: 11,04 (s a, 1H); 8,61 (s, 1H); 8,40 (s, 1H); 7,85-7,95 (m, 1H); 7,76 (dd, J = 5,4, 9,6 Hz, 1H); 7,70-7,78 (m, 1H); 7,52-7,63 (m, 3H); 7,38 (dt, J = 8,3, 10,6 Hz., 1H); 4,76-4,89 (m, 2H). EM (ES): m/z 466 (M+H), 331,305.

20



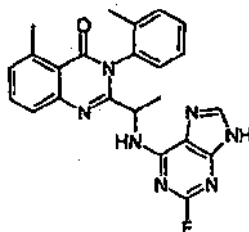
25

N-[3-(2-Clorofenil)-5-fluoro-4-oxo-3,4-dihidroquinazolin-2-ilmetil]-2-(9H-purin-6-ilsulfanil)-acetamida (D-077)

(9H-Purin-6-ilsulfanil)-ácido acético (63 mg, 0,296 mmol), 5b (108 mg, 0,355 mmol), EDC (68 mg, 0,355 mmol), HOBT (48 mg, 0,355 mmol), DIEA (62 µl, 0,355 mmol) y DMF (1 ml) se combinaron en un matraz y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción se diluyó con EtOAc (20 ml) y se lavó con salmuera diluida (2 x 13 ml). La fase

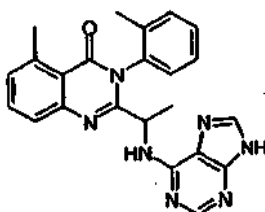
30

orgánica se concentró al vacío y se sometió a cromatografía en MeOH al 5 %/CH₂Cl₂ para proporcionar los 91 mg del producto en forma de una espuma viscosa de color melocotón. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 12,88 (s a, 1H); 8,72 (s, 1H); 8,62 (t, J = 5,0 Hz, 1H); 8,49 (s, 1H); 7,88 (dt, J = 5,6, 8,2 Hz, 1H); 7,73-7,78 (m, 1H); 7,67-7,72 (m, 1H); 7,57-7,65 (m, 2H); 7,38 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 7,36 (dd, J = 8,3, 11,1 Hz, 1H); 4,11-4,24 (m, 2H); 3,96 (dd, J = 5,0, 17,4 Hz, 1H); 3,78 (dd, J = 5,2, 17,4 Hz, 1H). EM (ES): m/z 496 (M+H), 248.



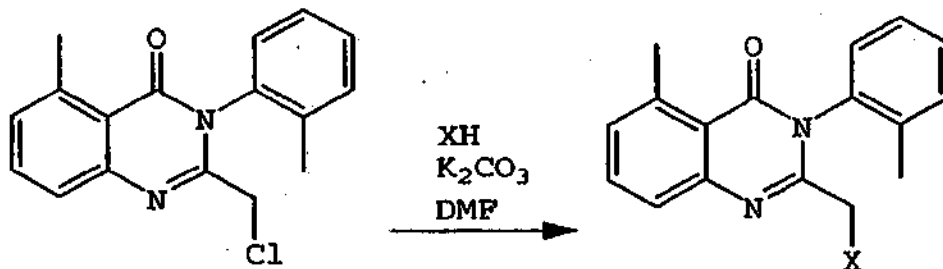
10 **2-[1-(2-Fluoro-9H-purin-6-ilamino)etil]-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-080)**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5c (50 mg, 0,17 mmol) y 2-fluoro-6-cloropurina (35 mg, 0,204 mmol) en 1,2 ml de EtOH. La purificación por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 5,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ) proporcionó dos atropisómeros en forma de sólidos de color blanco. Los datos para uno de estos, son como siguen a continuación: RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 8,48 (d a, J = 6,4 Hz, 1H); 8,17 (s, 1H); 7,69 (t, J = 7,8 Hz, 1H); 7,53 (d, J = 7,8 Hz, 1H); 7,44 (d, J = 7,8 Hz, 2H); 7,33 (d, J = 7,2 Hz, 2H); 7,07 (t a, J = 7,2 Hz, 1H); 4,80 (t a, J = 6,8 Hz, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 1,38 (d, J = 6,7 Hz, 3H). EM (ES): m/z 430 (M+H), 215.



20 **5-Metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)etil]-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-081)**

Preparado de acuerdo con el Procedimiento E usando 5c (50 mg, 0,17 mmol) y 6-cloropurina (32 mg, 0,204 mmol) en 1,2 ml de EtOH. La purificación por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ) proporcionó dos atropisómeros en forma de sólidos de color amarillo. Los datos para uno de estos, son como siguen a continuación: RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ: 8,39 (s a, 1H); 8,34 (s, 1H); 8,18 (s, 1H); 7,71 (t, J = 7,7 Hz, 1H); 7,56 (d, J = 7,9 Hz, 1H); 7,49 (d, J = 6,9 Hz, 1H); 7,28-7,43 (m, 3H); 7,20 (s a, 1H); 5,06 (s a, 1H); 2,73 (s, 3H); 2,04 (s, 3H); 1,51 (d, J = 6,6 Hz, 3H). EM (ES): m/z 412 (M+H), 206.

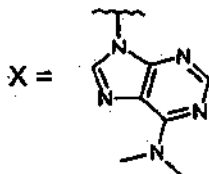


30 Los siguientes compuestos de la presente invención (D-082 a través de D-109) se prepararon como se representan en el Procedimiento C, usando 2-clorometil-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (10 mg), el nucleófilo XH apropiado (20 mg, exceso) y carbonato potásico (10 mg) en DMF (0,25 ml). La mezcla de reacción se agitó 16 h a temperatura ambiente, se inactivó con agua y el producto sólido en bruto se recogió por filtración y se secó al aire. El material en bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm,

4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220Å). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir los productos finales.

2-(6-Dimetilaminopurin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-082)

5



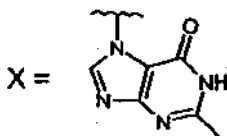
Rendimiento: 8,1 mg.

10 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,13 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,60 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,54-7,38 (m, 4H), 7,30 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,76 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 3,33 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 2,20 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 426 (M+1).

5-Metil-2-(2-metil-6-oxo-1,6-dihidro-purin-7-ilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-083)

15



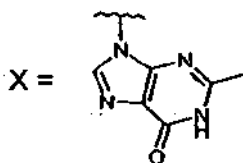
Rendimiento: 3,3 mg

20 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 12,06 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,60 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,38 (m, 4H), 7,30 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,15 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 4,94 (d, J = 17,4 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,24 (s, 3H). La alquilación en N₇ de purina asignada arbitrariamente basándose en el desplazamiento campo abajo de protones de metileno debido al grupo carbonilo.

LRMS (ES pos.) m/z = 413 (M+1).

5-Metil-2-(2-metil-6-oxo-1,6-dihidro-purin-9-ilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-084)

25



Purificada a partir de la misma mezcla de reacción que D-083.

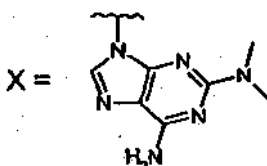
30 Rendimiento: 3,6 mg.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) 12,17 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,57-7,39 (m, 4H), 7,32 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,08 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,17 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 413 (M+1).

35

2-(Amino-dimetilaminopurin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-085)



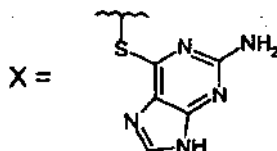
40 Rendimiento: 6,7 mg.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 7,66 (s, 1H), 7,61 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,40 (m, 4H), 7,32-7,26 (m, 2H), 6,74 (s, 2H), 4,94 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 2,97 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 441 (M+1).

5

2-(2-Amino-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-086)



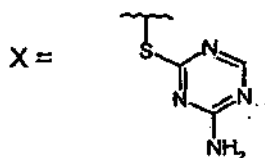
10 Rendimiento: 9,5 mg.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 12,54 (s, 1H), 7,89 (s, 1H), 7,69 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,43 (t, J = 3,9 Hz, 1H), 7,34 = 7,26 (m, 4H), 6,16 (s, 2H), 4,32 (cuarteto AB, J_{AB}=14,8 Hz, A_n=23,7), 2,74 (s, 3H), 2,09 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 430 (M+1).

15

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

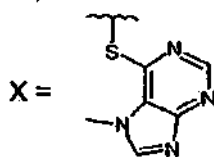


20 Rendimiento: 5,8 mg.

RMN 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).

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

5-Metil-2-(7-metil-7H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-088)



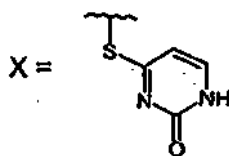
Rendimiento: 3,1 mg.

30 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,52 (s, 1H), 8,49 (s, 1H), 7,70 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,45 (d, J = 7,1 Hz, 1H), 7,35-7,20 (m, 4H), 4,41 (cuarteto AB, J_{AB}=15,3 Hz, A_v=19,2 Hz), 4,08 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 406 (M+1).

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

35



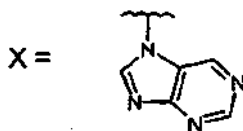
Rendimiento: 2,4 mg.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 11,49 (s, 1H), 7,70 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,60 (t a, J = 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).
LRMS (ES pos.) m/z = 391 (M+1).

5-Metil-2-purin-7-ilmetil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-090)

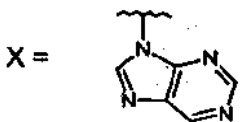
5



10 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 9,04 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 7,65-7,54 (m, 2H), 7,53-7,39 (m, 3H), 7,31 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,31 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,16 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). La alquilación en N₇ de purina se determinó por potenciación NOE entre el protón en la posición 6 de la purina en el enlazador entre los grupos de purina y quinazolinona.
LRMS (ES pos.) m/z = 383 (M+1).

5-Metil-2-purin-9-ilmetil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-091)

15



A partir de la misma reacción que produjo D-090.

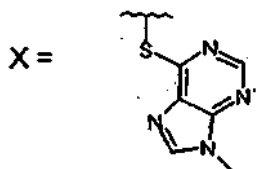
20 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 9,17 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,59 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,42 (m, 4H), 7,30 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,19 (s, 3H).

La alquilación en N₉ de purina sugirió que la falta de potenciación NOE entre los protones en la posición 6 de la purina y los enlazadores de los protones de metileno.

LRMS (ES pos.) m/z = 383 (M+1).

25

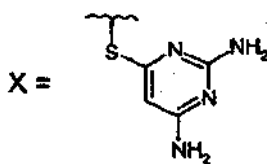
5-Metil-2-(9-metil-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-092)



30 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,52 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 7,69 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 7,36-7,27 (m, 4H), 4,38 (cuarteto AB, J_{AB}=15,5 Hz, A_v=21,0 Hz), 3,80 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,12 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 429 (M+1).

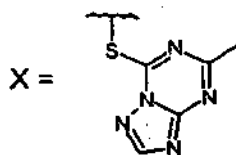
2-(2,6-Diamino-pirimidin-4-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-093)

35



40 RMN ¹H (300 MHz, d₆-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 (cuarteto AB, J_{AB}=14,6 Hz, A_v=26,9 Hz, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,08 (s, 3H).

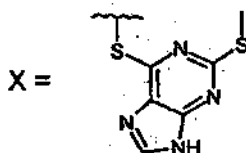
LRMS (ES pos.) m/z = 405 (M+1).

5-Metil-2-(5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-094)

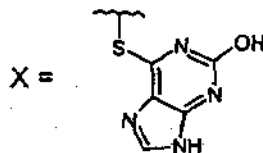
- 5 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,57 (s, 1H), 7,73 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,35 (m, 4H), 7,18 (s, 1H), 4,27 (s, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,55 (s, 3H), 2,08 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 429 (M+1).

5-Metil-2-(2-metilsulfanil-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-095)

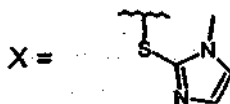
10



- 15 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,30 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,72 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,54 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,47 (d, J = 6,3 Hz, 1H), 7,38-7,26 (m, 4H), 4,34 (cuarteto AB, J_{AB}=16,1 Hz, A_v=23,6 Hz, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,10 (s, 3H). LRMS (ES pos.) m/z = 461 (M+1).

2-(2-Hidroxi-9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-096)

- 20 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 8,08 (s, 1H), 7,69 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,50 (d a, J = t.8 Hz, 2H), 7,33-7,50 (m, 4H), 4,28 (cuarteto AB, J_{AB}=15,5 Hz, A_v=21,3 Hz, 2H), 2,74 (s, 3H), 2,12 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 431 (M+1).

5-Metil-2-(1-metil-7H-imidazol-2-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-097)

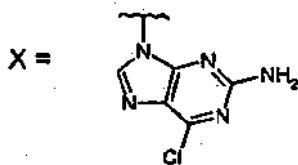
- 30 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 7,69 t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,46-7,37 (m, 5H), 7,32 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,20 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 6,48 (d, J = 1,0 Hz), 3,83 (cuarteto AB, J_{AB}=15,0 Hz, A_v=18,8 Hz, 1H), 3,55 (s, 3H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 364 (M+1).

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

- 35 RMN ¹H (3,00 MHz, d₆-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

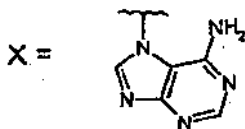
(m, 5H), 4,04 (cuarteto AB, $J_{AB}=15,5$ Hz, $A_v=19,1$ Hz, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,10 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) $m/z = 364$ (M+1).

5 **2-(2-Amino-6-cloro-purin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-099)**



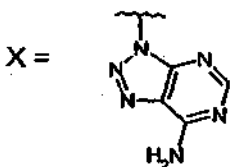
LRMS (ES pos.) 432 (M+1).

10 **2-(6-Aminopurin-7-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazoMn-4-ona (D-100)**



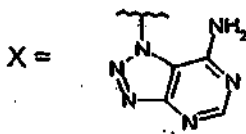
15 RMN ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 8,19 (s, 3H), 7,66 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,59-7,43 (m, 5H), 7,34 9d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,23 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,90 (s, 2H), 5,21 (cuarteto AB, $J_{AB}=17,4$ Hz, $A_v=22,1$ Hz, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,93 (s, 3H).
La alquilación en N_7 de purina se confirmó por potenciación NOE entre los siguientes protones: 1) Amina exocíclica y protones de metileno; 2) Amina exocíclica y protones de toluil metilo.
LRMS (ES pos.) $m/z = 398$ (M+1).

20 **2-(7-Amino-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidin-3-il-metil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-101)**



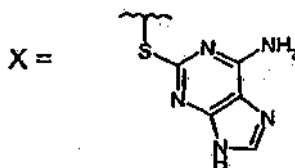
25 RMN ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 8,43 (s a, 1H), 8,19 (s, 1H), 8,10 (s a, 1H), 7,62 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,49-7,28 (m, 5H), 7,22 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,49 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H), 5,19 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,11 (s, 3H).
La alquilación en N_7 de purina se determinó de manera similar al espectro de RMN de D-030.
LRMS (ES pos.) $m/z = 399$ (M+1).

30 **2-(7-Amino-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidin-1-il-metil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-102)**



35 A partir de la misma mezcla de reacción que D-101.
RMN ^1H (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 8,27 (s, 1H), 8,20 (s a, 1H), 8,05 (s a, 1H), 7,70 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,47-7,26 (m, 6H), 5,61 (cuarteto AB, $J_{AB}=16,0$ Hz, $A_v=20,7$ Hz, 2H), 2,75 (s, 3H), 1,98 (s, 3H).
La alquilación N_7 de purina se determina de manera similar al espectro de RMN de D-100.
LRMS (ES pos.) $m/z = 399$ (M+1).

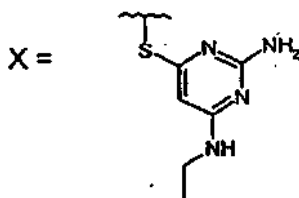
2-(6-Amino-9H-purin-2-ilsulfanilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-103)



- 5 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 12,62 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,69 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,42 (dd, J = 7,6,1,7 Hz, 1H), 7,35-7,15 (m, 6H), 4,12 (cuarteto AB, J_{AB}=14,5 Hz, A_v=18,2 Hz, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,10 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 430 (M+1).

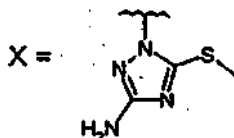
2-(2-Amino-6-etilamino-pirimidin-4-ilsulfanil-metil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-104)

10



- 15 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 7,70 (T, J = 7,8 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,44-7,31 (m, 5H), 6,69 (s a, 1H), 5,83, (s a, 2H), 5,61 (s, 1H), 4,03 (d, J = 14,6 Hz, 1H), 3,95 (d, J = 14,6 Hz, 1H), 3,22-3,11 (m, 2H), 2,73 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 1,06 (t, J = 7,1 Hz, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 433 (M+1).

2-(3-Amino-5-metilsulfanil-1,2,4-triazol-1-il-metil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-105)



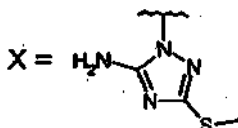
20

Rendimiento: 5,0 mg.

RMN ¹H (300 MHz, d₄-MeOH) δ: 7,67 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,37 (m, 4H), 7,35-7,27 (m, 2H), 4,77 (d, J = 17,1 Hz, 1H), 4,60 (d, J = 17,1 Hz, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

25 LRMS (ES pos.) m/z = 393 (M+1).

2-(5-Amino-3-metilsulfanil-1,2,4-triazol-1-il-metil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-106)



30

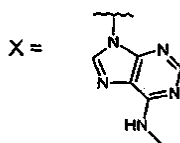
Rendimiento: 0,6 mg.

Purificada a partir de la misma mezcla de reacción que D-105.

RMN ¹H (300 MHz, d₄-MeOH) δ: 7,67 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,50-7,24 (m, 6H), 4,83 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 16,5 Hz, 1H), 2,79 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

35 LRMS (ES pos.) m/z = 393 (M+1).

5-Metil-2-(6-metilaminopurin-9-ilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-107)

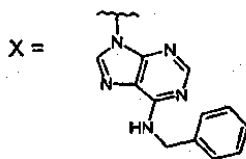


Rendimiento: 5,0 mg

RMN ¹H (300 MHz, *d*₄-MeOH) δ: 8,17 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,54-7,43 (m 4H), 7,31-7,23 (m, 2H), 5,14 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,90 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 3,14 (s a, 3H), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 412 (M+1).

2-(6-Bencilaminopurin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-108)

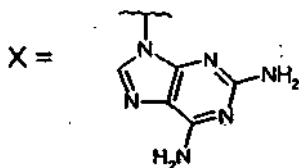


Rendimiento: 6,7 mg.

RMN ¹H (300 MHz, *d*₄-MeOH) δ: 8,13 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,58 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,51-7,21 (m, 11H), 5,15 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,91 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H, en picos de H₂O), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 488 (M+1).

2-(2,6-Diaminopurin-9-ilmetil)-5-metil-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-109)

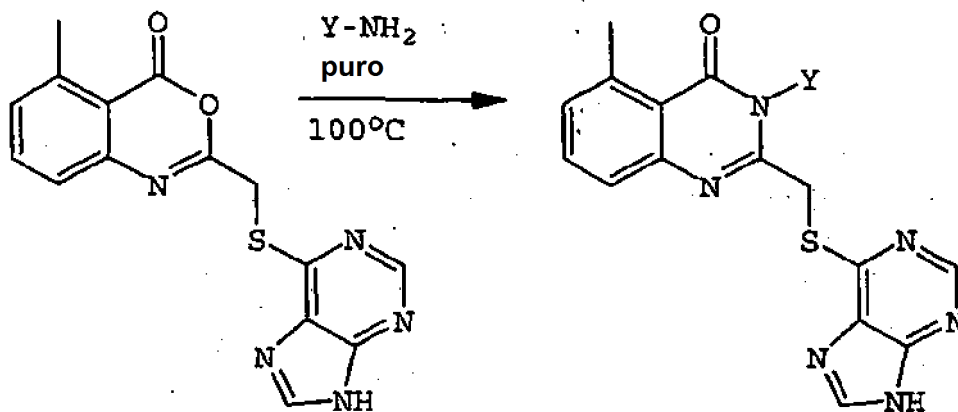


Duplicada las cantidades de todos los reactivos. Rendimiento: 14 mg.

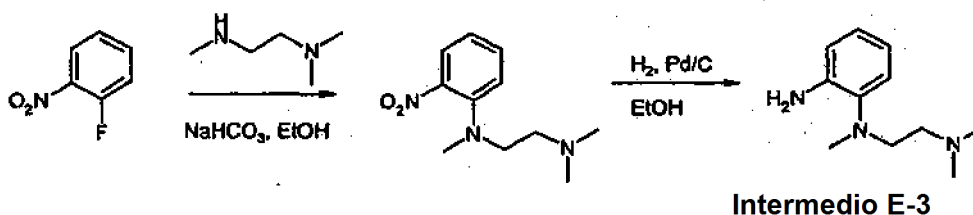
RMN ¹H (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ: 8,53 (s a, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,54 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,33 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 4,96 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,64 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,17 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 413 (M+1).

Los compuestos D-110 a través de D-115 de la siguiente estructura general se prepararon a partir de los siguientes Intermedios E-1 a través de E-3.



Intermedio E-1.



Una mezcla de 2-fluoro-nitrobenceno (1,41 g, 10 mmol) y NaHCO₃ en EtOH (20 ml) se trató con (N,N,N'-trimetil)-1,2-diaminoetano (1,1 g, 11 mmol) y se agitó 16 h a 80 °C. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se trató con NaOH 0,1 M (120 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con 20 ml de agua (1x) y salmuera (2 x), se secaron con sulfato sódico y se concentraron al vacío en un líquido de color naranja (2,2 g, 100 %; ESEM: m/z = 224, M+1).

Este intermedio se disolvió en EtOH, la solución se purgó con nitrógeno, se trató con Pd(OH)₂ (20 % en peso sobre C, 180 mg, cat.) y se sacudió durante 2 h en H₂ (0,34 MPa (50 psi)). El catalizador se retiró por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,22 μm (Corning), y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar el producto líquido de color rojo E-3 (1,8 g, 95 %).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ: 8,64 (s, 1H), 7,03 (dd, J = 8,3, 1,4 Hz, 1H), 6,91 (ddd, J = 7,6, 7,2, 1,4 Hz, 1H), 6,73-6,67 (m, 2H), 4,20 (s a, 2H), 2,95 (t, J = 6,7 Hz, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,41 (t, J = 6,7 Hz, 1H), 2,26 (s, 6H).
LRMS (ES pos.) m/z=194 (M+1).

Se prepararon los compuestos D-110 a través de D-115 como sigue a continuación:

5-Metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3-o-tolil-3H-quinazolin-4-ona (D-110)



Una mezcla del Intermedio E-1 (40 mg) y o-toluidina (0,3 ml, gran exceso) se calentó a 100 °C en un vial cerrado herméticamente durante 16 h. La mezcla de reacción se enfrió, se trató con HCl 1 N (2 ml) y éter (2 ml), y el precipitado de color gris resultante se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó al aire (19 mg en bruto). El sólido en bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (4

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,52 (s, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,43 (s, 1H), 7,69 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,50 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,46-7,43 (m, 1H), 7,37-7,25 (m, 4H), 4,37 (cuarteto AB, J_{AB}=15,4 Hz, A_v=22,4 Hz, 2H), 2,74 (5, 3H), 2,12 (5, 3H).
LRMS (ES pos.) m/z = 415 (M+1).

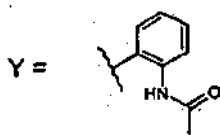
3-Isobutil-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-111)



Una mezcla del Intermedio E-1 (40 mg) e isobutilamina (0,4 ml, gran exceso) se calentó a 120 °C en un vial cerrado herméticamente durante 16 h. El exceso de isobutilamina se dejó evaporar, el residuo se disolvió en 1 ml de DMSO y se purificó en dos porciones por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (4 mg).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,75 (s a, 1H), 8,73 (s, 1H), 8,50 (s, 1H), 7,63 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,42 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,28 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 4,96 (s, 2H), 4,00 (d, J = 7,5 Hz, 2H), 2,77 (s, 3H), 2,30-2,15 (m, 1H), 0,98 (d, J = 6,7 Hz, 1H).
LRMS (ES pos.) m/z = 381 (M+1).

N-{2-[5-Metil-4-oxo-2-(9H-purin-6-ilsulfanil-metil)-4H-quinazolin-3-il]-fenil}-acetamida (D-112)



Una mezcla del Intermedio E-1 (80 mg, 0,25 mmol) y el Intermedio E-2 (75 mg, 0,5 mmol, 2 equiv.) se calentó hasta que se fundió en un vial cerrado herméticamente usando una pistola de calor. La mezcla de reacción se trituró con éter y los sólidos se recogieron por filtración. El material en bruto se disolvió en 1 ml de DMSO y se purificó en dos porciones por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco.

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,52 (s, 1H), 9,52 (s, 1H), 8,48 (s, 3H), 8,42 (s, 3H), 8,02 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,69 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,51 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,45-7,37 (m, 2H), 7,31 (d, J = 7,3 Hz, 1H), 7,19 (t, J = 7,5 Hz, 1H), 4,38 (s, 2H), 2,74 (s, 3H), 1,93 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 458 (M+1).

5-Metil-3-(E-2-metil-ciclohexil)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-113)

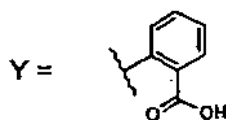


Una mezcla del Intermedio E-1 (80 mg, 0,25 mmol) y trans-2-metil-1-aminociclohexano (0,25 ml, gran exceso) se calentó en un recipiente sellado a 100 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se trituró con éter y los sólidos se recogieron por filtración. El material en bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (1,5 mg).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,5 (s, 1H), 8,82 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 7,63 (t, J = 7,7 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,27 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 5,11 (d, J = 14,5 Hz, 1H), 3,78-3,69 (m, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,55-2,40 (m, 3H), 1,88-1,46 (m, 4H), 1,31-1,11 (m, 1H), 0,90-0,65 (m, 1H), 0,74 (d, J = 6,7 Hz, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 421 (M+1).

Ácido 2-[5-metil-4-oxo-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-4N-quinazolin-3-il]-benzoico (D-114)

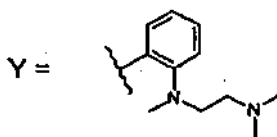


Una mezcla del Intermedio E-1 (80 mg, 0,25 mmol) antranilato de metilo (0,25 ml, gran exceso) se calentó en un vial cerrado herméticamente a 100 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se trituró con éter y los sólidos se recogieron por filtración. El material en bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (8 mg).

RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,51 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,11 (dd, J = 7,4, 1,1 Hz, 1H), 7,88 (dt, J = 7,7, 1,4 Hz, 1H), 7,70 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,57 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,49-7,35 (m, 3H), 4,58 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 4,35 (d, J = 15,5 Hz, 1H), 2,44 (s, 3H).

LRMS (ES pos.) m/z = 445 (M+1).

3-{2-[(2-Dimetilamino-etil)-metil-amino]-fenil}-5-metil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-115)



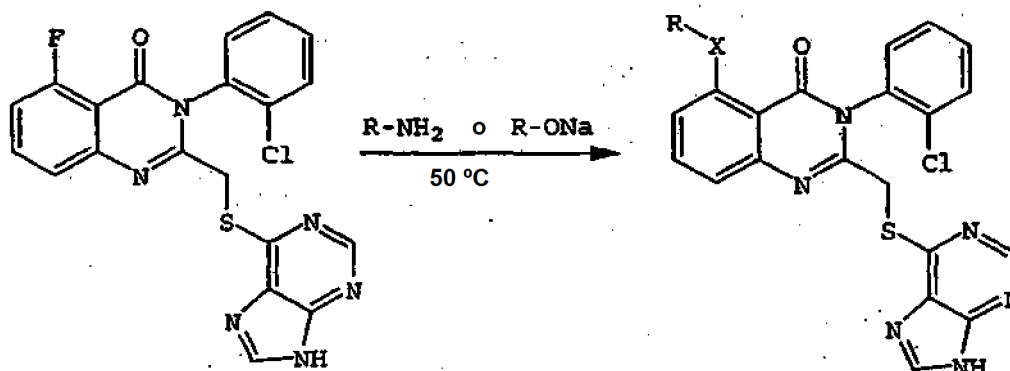
Una mezcla del Intermedio E-1 (40 mg, 0,25 mmol) Intermedio E-3 (0,2 ml, gran exceso) se calentó en un vial cerrado herméticamente a 100 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se trituró con éter y los sólidos se recogieron por filtración. El material en bruto se disolvió en 1 ml de DMSO y se purificó por HPLC en dos porciones (columna C18

Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, TFA al 0,05 % en todos los disolventes, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de la sal TFA (11 mg).

5 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,4 (s a, 1H), 9,27 (s, 1H), 8,52 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 7,72 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,53 (d, J = 7,9 Hz, 1H), 7,40-7,33 (m, 4H), 7,10-7,04 (m, 1H), 4,42 (s, 3H), 3,5 (m, 2H), 3,23-3,03 (m, 3H), 2,75 (s, 3H), 2,68-2,56 (m, 8H).

LRMS (ES pos.) m/z = 501 (M+1).

10 Se prepararon los compuestos D-116 a través de D-118 como sigue a continuación:



3-(2-Clorofenil)-5-metoxi-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-116)

15 (R = Me, X = O)

Una mezcla de D-015 (25 mg) en NaOMe 0,5 M (2 ml en MeOH; gran exceso) se agitó a 50 °C durante 16 h en un vial cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se trató con agua (5 ml), y el precipitado resultante se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó al aire. El material en bruto se disolvió en 20 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (5,3 mg).

25 RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,52 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 8,44 (s a, 1H), 7,77 (t, J = 8,2 Hz, 1H), 7,71-7,60 (m, 2H), 7,51-7,34 (m, 2H), 7,23 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,10 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,39 (cuarteto AB, J_{AB}=5,2 Hz, Av=23,2 Hz, 2H), 3,85 (s, 3H).

LRMS (ES positivo) m/z = 451 (M+1).

3-(2-Clorofenil)-5-(2-morfolin-4-il-etilamino)-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-117)



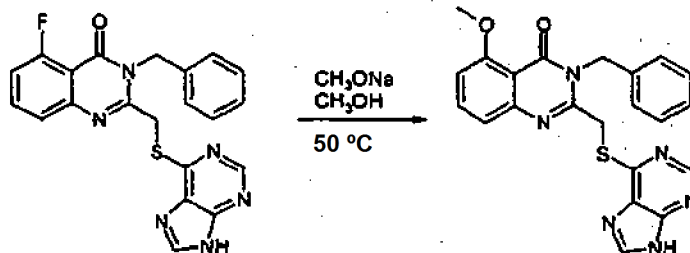
30

Una mezcla de D-015 (25 mg) y 4-(aminoet-2-il)-morfolina (650 mg, gran exceso) se agitó a 50 °C durante 16 h. La mezcla de reacción bruta se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final.

35 RMN ¹H (300 MHz, d₆-acetona) δ: 8,57 (s a, 1H), 8,47 (s, 1H), 8,37 (s, 1H), 7,72 (dd, J = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,65 (dd, J = 8,0, 1,2 Hz, 1H), 7,57 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,49 (dt, J = 7,7, 1,6 Hz, 1H), 7,40 (dt, J = 7,7, 1,5 Hz, 1H), 6,86 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 6,82 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 4,55 (d, J = 15,0 Hz, 1H), 4,42 (d, J = 15,1 Hz, 1H), 4,05-3,90 (m, 4H), 3,90 (t, J = 6,9 Hz, 2H), 3,75-3,4 (m, 4H), 3,54 (t, J = 6,9 Hz, 2H).

40 LRMS (ES positivo) m/z = 549 (M+1).

3-Bencil-5-metoxi-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona (D-118)



Una mezcla de D-043 (25 mg) en NaOMe 0,5 M (2 ml en MeOH; gran exceso) se agitó a 50 °C durante 16 h en un vial cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se trató con HCl 1 N (1 ml) y alícuotas de esta solución (cada una de 0,5 ml) se purificaron por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75 %/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100 % a 18 min, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir el producto final en forma de un sólido de color blanco (6,6 mg). RMN ¹H (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 13,57 (s, 1H), 8,60 (s, 1H), 8,45 (s, 1H), 7,72 (t, J = 8,1 Hz, 1H), 7,42-7,30 (m, 2H), 7,30-7,19 (m, 3H), 7,15 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 5,43 (s, 2H), 4,80 (s, 2H), 3,87 (s, 3H). LRMS (ES positive) m/z = 431 (M+1).

Compuesto D-999 (comparativo)

3-(2-Clorofenil)-2-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona

Un compuesto análogo, 3-(2-clorofenil)-2-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona, también se sintetizó generalmente acuerdo con los métodos descritos, excepto que se sustituyó una 4-mercapto-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina por la mercapto purina en la etapa final.

Ejemplo 11

Ensayos bioquímicos de potencia y selectividad de PI3K

A. Ensayo bioquímico usando ATP 20 μM

Utilizando el método descrito en el Ejemplo 2, más arriba, los compuestos de la invención se ensayaron para la actividad y la potencia inhibitoria contra PI3Kδ y para la selectividad para PI3Kδ frente a otras isoenzimas PI3K de Clase I. En la Tabla 2, los valores de CI₅₀ (μM) se dan para PI3Kα ("Alfa"), PI3Kβ ("beta"), PI3Kγ ("Gama") y PI3Kδ ("Delta"). Para ilustrar la selectividad de los compuestos se dan las relaciones de los valores de CI₅₀ de los compuestos para PI3Kα, PI3Kβ y PI3K en relación con PI3Kδ, respectivamente, como "Relación Alfa/Delta", "Relación Beta/Delta" y "Relación Gama/Delta".

Los ensayos de selectividad iniciales se realizaron de forma idéntica al protocolo del ensayo de selectividad en el Ejemplo 2, excepto que usando 100 μl de Ecoscint para la detección de marcadores radioactivos. Los ensayos de selectividad posteriores se realizaron de forma similar usando las mismas soluciones madre de sustrato excepto que contenían γ[³²P] ATP 0,05 mCi/ml y PIP₂ 3 mM. Los ensayos de selectividad posteriores también utilizaron las mismas soluciones madre de enzima 3X, excepto que ahora contenían 33 nM de cualquiera dada isoforma de PI3K.

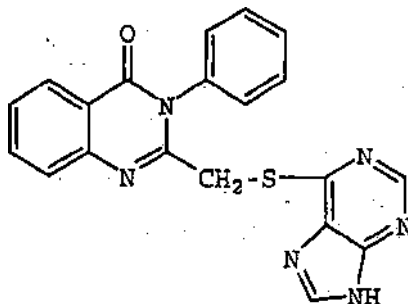
Para todos los ensayos de selectividad, los compuestos de ensayo se pesaron y se disolvieron en soluciones madre en 10-50 mM en DMSO al 100 % (en función de sus respectivas solubilidades) y se almacenaron a -20 °C. Los compuestos fueron descongelados (hasta la temperatura ambiente o 37 °C), se diluyeron hasta 300 μM en agua de la que se hizo una serie de dilución de 3 veces en agua. A partir de estas diluciones, 20 μl se añadieron a los pocillos de ensayo junto con blancos de agua para el control (positivo) y control (fondo) sin enzima. El resto del ensayo se realizó esencialmente de acuerdo con el protocolo del ensayo de selectividad en el Ejemplo 2.

Para aquellos casos en los que la concentración más alta utilizada en el ensayo, es decir, 100 μM, no inhibió la actividad de la enzima en al menos un 50 %, la tabla recita la actividad porcentual restante en esa concentración (es decir, 100 μM). En estos casos, la relación o relaciones de actividad reales para los compuestos no se pueden calcular, ya que se carece de uno de los valores de CI₅₀ requeridos. Sin embargo, para proporcionar alguna clarificación sobre las características de estos compuestos, una relación de actividad hipotética se calcula utilizando 100 μM sustituidos para el valor que falta. En tales casos, la relación de selectividad debe ser, en realidad, mayor que el valor hipotético, y esto se indica mediante el uso de un símbolo de mayor que (>).

ES 2 567 260 T3

Tabla 2							
Compuesto	Cl ₅₀ alfa	Cl ₅₀ Beta	Cl ₅₀ Delta	Cl ₅₀ Gama	Relación Alfa/Delta	Relación Beta/Delta	Relación Gama/Delta
D-000	86 %	74 %	0,33	7,7	>302	>302	23
D-001	83 %	45	68		>1,5	0,66	
D-002	88 %	78 %	44		>2,3	>2,3	
D-003	92	53 %	4		22	>24	
D-004	93 %	89 %	64		>2	>1,6	
D-005	89 %	46	0,8		>121	56	
D-006	78 %	6	0,15		>652	38	
D-007	82 %	30	0,16		>619	188	
D-008	82 %	68	1,2		>85	57	
D-009	82	6	0,12		683	50	
D-010	48	11	0,06	0,70	800	183	12
D-011	72 %	55	0,10	1,0	>1.000	550	10
D-012	69 %	11	0,17		>588	65	
D-013	71 %	13	0,05	2,1	>2.000	260	42
D-014	63 %	3,6	0,06	0,56	>1.667	60	9,3
D-015	65 %	69 %	0,21	3,6	>480	>480	17
D-016	91 %	81 %	40		>2,5	>3	
D-017	89 %	108 %	12		>8	>8	
D-018	88 %	93 %	4,2		>24	>24	
D-019	67	105	7		10	15	
D-020	69 %	69 %	1,9		>53	>53	
D-021	100	110	1,6		62	66	
D-022	81 %	110	0,8	40	>125	137,50	50
D-023	83 %	91 %	26		>4	>3,9	
D-024	100	76 %	2,6		38	>38	
D-025	73 %	61 %	0,11	1,5	>909	>909	14
D-026	68 %	54 %	0,08	1,7	>1.250	>1.250	21
D-027	59 %	58	0,6		>169	97	
D-028	67 %	13	0,18		>556	69	
D-029	49	3,0	0,06		882	5,4	
D-030	50	5	0,07		758	70	
D-031	74	10	0,12		>833	83	
D-034	19	11	0,15		131	74	
D-035	9	3	0,05		199	65	
D-036	63 %	31	0,4		>226	69	
D-037	64 %	80	0,8		>125	100	
D-039	77 %	66 %	0,9	38	>111	>111	42
D-038	77 %	63 %	0,6	60	>167	>170	100
D-040	77 %	64 %	1,7		>61	>61	
D-041	67 %	65 %	4		>25	>25	
D-042	70 %	25	3		>32	8	
D-043	83 %	77 %	2,1		>47	>47	
D-044	105	61	4,2		25	15	
D-045	98 %	74 %	7,6		>13	>13	
D-046	64 %	95	9		>11	11	
D-047	30	9	0,09	0,5	333	100	5,6
D-048	70	14	0,16		449	50	
D-049	110 %	30	1,0		>100	30	
D-050	99 %	41	1,6		>63	26	
D-051	89 %	57 %	3,3		>31	>31	
D-052	0,7	69 %	8		0,09	>13	
D-121	69 %	70 %	0,48		>211	>211	
D-999	105	71 %	47	60	2,2	2,1	1,3
LY294002	1,2	0,4	0,23		5,3	1,7	

1) El compuesto D-121 es 3-fenil-2-(9H-purin-6-ilsulfanilmetil)-3H-quinazolin-4-ona



B. Ensayo bioquímico usando ATP 200 μ M

5

En la Parte A, anterior, los compuestos de la invención se ensayaron para determinar su CI_{50} para la inhibición de las isoformas alfa, beta, delta y gamma de PI3K usando ATP 20 μ M. Se realizó una selección adicional para establecer la CI_{50} para la inhibición de las cuatro isoformas de PI3K a una concentración final de ATP 200 μ M, 10 veces mayor, y sustancialmente más cerca de la concentración fisiológica de ATP en las células. Este protocolo de selectividad es

10

idéntico al descrito anteriormente, excepto que la concentración de ATP de la solución madre 3X fue de 600 μ M. Los datos de este ensayo se resumen en la Tabla 3, a continuación. La sensibilidad observada frente a la concentración de ATP sugiere que estos compuestos inhibidores de PI3K δ actúan como competidores de ATP.

Tabla 3

Compuesto	Cl ₅₀ Alfa	Cl ₅₀ Beta	Cl ₅₀ Delta	Cl ₅₀ Gama	Relación Alfa/Delta	Relación Beta/Delta	Relación Gama/Delta
D-000	91±1 %	84±2 %	2±1	35±35	91	84	18
D-005	104 %	82 %	11	91 %	20	16	17
D-006	104±1 %	44±5	0,92±0,1	87±33	226	48	95
D-007	92±11 %	72±12	0,73±0,2	88±4	252	99	121
D-009	70 %	18	0,7	53	200	26	76
D-010	74±18 %	33±4	0,23±0,2	6±3	658	144	27
D-011	88±4 %	105±35	0,25±0,2	61±70	700	420	244
D-012	70±44 %	108±4	1,3±0,4	50±0	107	83	38
D-013	117±8 %	73±24 %	0,51±2,6	12 ± 1	461	289	24
D-014	100±6 %	13±0	0,5±0,4	5±3	398	26	10
D-015	95±22 %	81±3 %	1,1±0,5	83±37 %	180	154	160
D-019	100 %	100	30	33	7	3	1
D-022	88 %	101 %	4,2	60 %	42	48	29
D-025	89±11 %	77±6 %	0,32±0,3	7,8±3	556	478	24
D-026	83±1 %	77±8 %	0,38±0,2	13±10	443	411	34
D-027	74 %	110	4	60	37	28	15
D-028	100 %	81 %	1,6	29	125	101	18
D-029	110±12 %	34±4	0,34±0,08	13±0,7	653	101	37

D-030	95±11 %	80±14	0,53±0,05	31 ± 10	362	152	59
D-031	87±10 %	137±23	0,2±0,01	155±60	903	707	802
D-034	92±11 %	103±4	1,2±0,3	34±1	153	85	28
D-035	95±6	34±6	0,49±0,1	6,8±1	193	69	14
D-036	99 %	73 %	4,1	72	48	36	18
D-037	112 %	58 %	3,5	45	64	33	13
D-038	69 %	74 %	1,8	55	77	82	31
D-039	85 %	65 %	2,6	57 %	65	50	44
D-047	81 %	30	0,2	4,5	810	150	23
D-048	90±57	95±7	1,4±0,9	123±40	67	70	91
D-121	71 %	62 %	0,9	61 %	158	138	136
D-999	62 %	71 %	75	90	2	2	1
LY294002	23±5	3,7±2	2,1±1,5	29±13	11	2	13

Ejemplo 12**Datos de ensayo basado en células para inhibidores de la actividad de PI3K δ**

- 5 Utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 3-5 anteriores, los compuestos de la invención se ensayaron para la actividad y potencia inhibidora en ensayos de proliferación de células B y T estimulada, migración de neutrófilos (PMN) y la liberación de elastasa de los neutrófilos (PMN). Los datos de estos ensayos se exponen en la Tabla 4, a continuación. En la Tabla 4, los valores que se muestran son las concentraciones eficaces del compuesto (CE₅₀, μ M). Donde no se proporcione ningún valor, no se llevó a cabo ninguna prueba.

10

Tabla 4				
Compuesto	Estim. BCR en ratones (CE ₅₀)	Estim. TCE en ratones (CE ₅₀)	Elastasa de PMN humanos (CE ₅₀)	Migración de PMN humanos (CE ₅₀)
D-000	0,9±0,4	5,5±4	2,2±2	1-5
D-003	3,9	5,7		
D-005	0,7±0,1	3,9	4,3±1	
D-006	0,2±0,1	5,3	0,3±0,1	
D-007	0,3±0,1	4,2	0,4	
D-008	1,0			
D-009	0,3±0,2		10,5	
D-010	0,2±0,1		0,3±0,3	
D-011	0,3±0,1		0,9±0,7	
D-012	0,3±0,2		0,3	
D-013	1,4			
D-014	0,2±0,1	4,3		
D-015	1,2±0,2	1,8	1,3±0,4	2,0
D-019	0,9±0,01	0,9		
D-021	1,8	3,5		
D-022	1,8	2,3		
D-024			2,9	
D-025	0,3±0,1	4,4±0,6	0,3±0,2	0,3±0,3
D-026	0,3±0,1	3,5	0,2±0,2	0,3±0,3
D-027	>2		2	
D-028	0,4±0,2		1	
D-029	0,1±0,03	3,4±2	0,5±0,6	0,3
D-030	0,1±0,1	6	0,4±0,5	0,2
D-031	0,2±0,1		0,7±0,1	
D-034	0,6±0,4			
D-035	0,2±0,1	2,9±0,7	0,3±0,1	
D-036	0,9±0,04	4,1	5,5±5	0,2
D-037	1,2±0,4		1,3±0,4	2,0
D-038	1,4±0,1	2,9	5	
D-039	0,9±0,1		5	
D-043	1,4	2,6		
D-045			9,0	
D-047	0,3±0,2		0,5±0,2	
D-048	0,4±0,2	5	0,9±0,2	
D-049	2,0	6,3	5,0	
D-121	1,4			
D-999	3,1±0,7	5,9	>20	1
LY294002	0,9±0,5			

Ejemplo 13**Ensayo de inhibidores de la actividad de PI3K δ en células de cáncer**

15

El efecto de los compuestos de la invención sobre la proliferación de células de cáncer se evaluó mediante ensayo de uno de los compuestos contra un panel de líneas celulares de Leucemia Mielógena Crónica (CML), incluyendo KU812, RWLeu4, K562 y MEG-01.

La actividad inhibidora del compuesto (D-000, disuelto en DMSO) se determinó como sigue. El compuesto ensayado se añadió en una serie de concentraciones (0,001 μM a 20 μM) a placas de microtitulación de 96 pocillos con células (1000 a 5000 células/pocillo). Las placas se incubaron durante cinco días a 37 °C durante los cuales los cultivos de control sin compuesto de ensayo fueron capaces de pasar por, por lo menos, dos ciclos de división celular. El crecimiento celular se midió mediante la incorporación de [^3H]-timidina durante dieciocho horas, adicionada en los días tres, cuatro y cinco. Las células se transfirieron a un filtro, se lavaron y la radioactividad se contó usando un contador beta Matrix 96 (Packard). El porcentaje de crecimiento celular se midió como sigue:

$$\% \text{ de crecimiento celular} = \frac{\text{(recuentos medios de células incubadas con una concentración dada de inhibidor)} \times 100}{\text{(recuentos medios de células sin inhibidor)}}$$

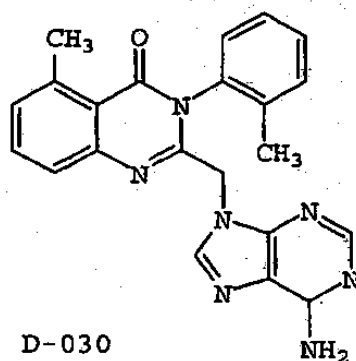
El valor de CE_{50} en estos experimentos se determinó mediante la concentración de compuesto de ensayo que dio lugar a un recuento de radioactividad 50 % menor que la obtenida utilizando el control sin inhibidor. El compuesto D-000 exhibió actividad inhibitoria con una CE_{50} de aproximadamente 2 μM para las líneas de KU812 y RWLeu4. No se verificó que el compuesto presentaba un efecto en las líneas K562 y MEG-01.

Los inhibidores de PI3K δ de la invención parecen inhibir el crecimiento celular de CML y, por lo tanto, podrían ser útiles en el tratamiento de tumores benignos o malignos. La expresión de PI3K δ se ha demostrado, hasta ahora, principalmente en células de origen hematopoyético. Sin embargo, podría estar presente en una variedad más amplia de células proliferantes. Por lo tanto, los compuestos de la invención podrían ser utilizados para inducir la regresión tumoral y para prevenir la formación de metástasis de tumores tanto en la leucemia como en tumores sólidos o en la proliferación de origen no tumoral. Adicionalmente, los compuestos se podrían utilizar solos y en combinación con otros compuestos farmacológicamente activos o en combinación con radiación como agente sensibilizante.

Ejemplo 14

Medición de la exocitosis de elastasa en el lavado de la bolsa de aire en ratones

Se ensayó el efecto de D-030 en el flujo de leucocitos y exocitosis de elastasa de neutrófilos en modelos animales. El modelo de bolsa de aire de seis días es un modelo de inflamación *in vivo* que se asemeja histológicamente a una membrana sinovial articular. Se desarrolla una capa de células mononucleares y fibroblastos organizados que se asemeja a una cavidad sinovial. El modelo representa un modelo "agudo" de una enfermedad crónica (por ejemplo, artritis reumatoide). Este modelo permite la evaluación *in vivo* de los agentes para bloquear el flujo de células para el interior de la bolsa de aire bajo la influencia de un estímulo inflamatorio.



El ensayo se realizó de la siguiente manera: en el día cero, grupos de ratas se afeitaron y se inyectaron 10 ml de aire por vía subcutánea en la parte posterior de cada uno, formando una bolsa. En el día tres, se inyectaron de nuevo 10 ml de aire. Seis horas antes de la estimulación con TNF en el sexto día, un grupo de ratas ($n = 6$) recibió D-030 (100 mg/kg en vehículo PEG 400) por vía oral, y otro grupo ($n = 12$) recibió solamente vehículo por vía oral. Seis horas después de la dosificación, las bolsas de aire de ambos grupos recibieron 2,5 ng de TNF. Doce horas después de la dosificación, las bolsas se lavaron con solución salina, y el líquido de lavado resultante se analizó para los recuentos de leucocitos y la actividad de elastasa de neutrófilos. Además, se extrajo sangre para determinar los niveles de D-030 en circulación. Los resultados fueron los siguientes: las ratas que recibieron D-030 durante doce horas tenían un promedio de 8,7 μM de compuesto en la circulación y tuvieron una reducción de 82 % en los leucocitos totales en el fluido de lavado en comparación con los controles de vehículo. Las reducciones en los recuentos de leucocitos específicos fueron las siguientes: neutrófilos (90%), eosinófilos (66%) y linfocitos (70%). La cuantificación de elastasa

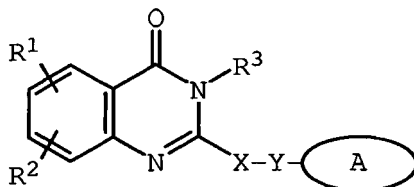
de neutrófilos mostró que las ratas tratadas con D-030 tenían niveles de elastasa que, en cierta medida, eran reducidos (15 %) en comparación con los controles de vehículo.

5 En otro ensayo, un área de la parte posterior de los ratones se afeitó con maquinilla, y se crió una bolsa de aire mediante la inyección de 3 ml de aire por vía subcutánea. En el día tres, se repitió la inyección de aire. En el día seis, se administraron a los animales dosis de D-030 (32 mg/kg en LABRAFIL®) o solo LABRAFIL® una hora más tarde y dos horas después de la estimulación con TNF- α (0,5 ng en 1 ml de PBS) o solo PBS. PBS es solución salina tamponada con fosfato. Cuatro horas después de la estimulación con TNF, los animales fueron anestesiados y las
10 bolsas se lavaron con 2 ml de solución salina al 0,9 % con EDTA 2 mM. Los lavados se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrifuga. Cincuenta microlitros del sobrenadante se utilizaron para medir la exocitosis de elastasa de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Como se muestra en la Figura 9, la estimulación con TNF indujo un alto nivel de exocitosis de elastasa en comparación con animales estimulados con PBS. Sin embargo, cuando los animales estimulados con TNF fueron tratados con
15 D-030, se observó una disminución significativa en la actividad de elastasa en los lavados de las bolsas de aire.

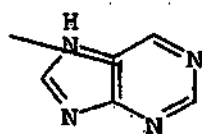
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una fórmula estructural general:



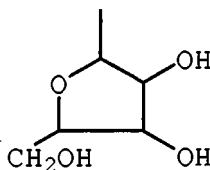
5

en la que A es



10

que está, sin sustituir o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en N(R^a)₂, alquilo C₁₋₃, S(alquilo C₁₋₃), OR^a, halo y



15

X se selecciona del grupo que consiste en CHR^b, CH₂CHR^b y CH=C(R^b);

Y es SO o SO₂;

R¹ y R², independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, halo, NHC(=O)alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, NO₂, OR^a, CF₃, OCF₃, N(R^a)₂, CN, OC(=O)R^a, C(=O)R^a, C(=O)OR^a, aril OR^b, Het, NR^aC(=O)alquilen C₁₋₃C(=O)OR^a, arilOalquilen C₁₋₃-N(R^a)₂, arilOC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, C(=O)-NR^aSO₂R^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₂₋₆N(R^a)₂, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄CH(OR^b)CH₂N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄OR^a, Oalquilen C₂₋₄-NR^aC(=O)OR^a, NR^aalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, NR^aC(=O)R^a, NR^aC(=O)N(R^a)₂, N(SO₂alquilo C₁₋₄)₂, NR^a(SO₂alquilo C₁₋₄), SO₂N(R^a)₂, OSO₂CF₃, alquilen C₁₋₃arilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₆OR^b, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, C(=O)N(R^a)₂, NHC(=O)alquilen C₁₋₃arilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, arilOalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, arilOC(=O)R^b, NHC(=O)alquilen C₁₋₃heterocicloalquilo C₃₋₈, NHC(=O)alquilen C₁₋₃Het, Oalquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^b, C(=O)alquilen C₁₋₄Het y NHC(=O)halo C₁₋₆alquilo; o

R¹ y R² se toman juntos para formar un componente con una cadena de alquilenilo o de alquilenilo de 3 o 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

R³ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alquilen C₁₋₃arilo, aril-alquilo C₁₋₃, C(=O)R^a, arilo, heteroarilo, C(=O)OR^a, C(=O)N(R^a)₂, C(=S)N(R^a)₂, SO₂R^a, SO₂N(R^a)₂, S(=O)R^a, S(=O)N(R^a)₂, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄arilo opcionalmente sustituido con uno o más de halo, SO₂N(R^a)₂, N(R^a)₂, C(=O)OR^a, NR^aSO₂CF₃, CN, NO₂, C(=O)R^a, OR^a, alquilen C₁₋₄-N(R^a)₂ y Oalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄-C(=O)Het, alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a y alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a;

R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, arilo, aril C₁₋₃alquilo, alquilen C₁₋₃arilo, heteroarilo, heteroaril C₁₋₃alquilo y alquilen C₁₋₃heteroarilo;

o dos grupos R^a se toman juntos para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que opcionalmente contiene al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, aril C₁₋₃alquilo, heteroaril C₁₋₃alquilo, alquilen C₁₋₃arilo y alquilen C₁₋₃heteroarilo;

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;

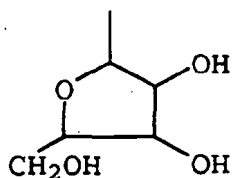
y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos,

5 en donde "arilo", se define como un grupo aromático monocíclico o bicíclico, que puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo

10 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, oxígeno o azufre en un anillo aromático, y que puede estar sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo.

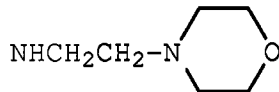
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que X selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃) y C(CH₃)₂.

15 3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el sistema del anillo A está sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en NH₂, NH(CH₃), N(CH₃)₂, NHCH₂C₆H₅, NH(C₂H₅), Cl, F, CH₃, SCH₃, OH y



20 4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, OR^a, halo, alquilo C₁₋₆, CF₃, NO₂, N(R^a)₂, NR^aalquilen C₁₋₃N(R^a)₂ y Oalquilen C₂₋₄R^a.

5. El compuesto de la reivindicación 3, en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

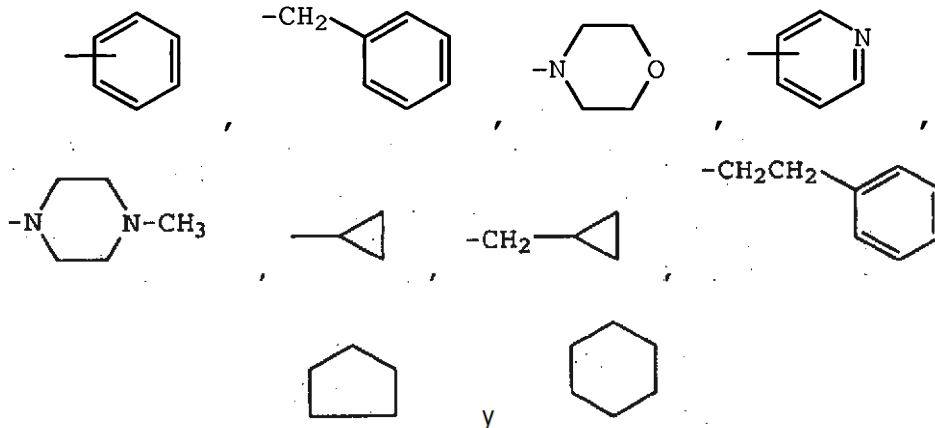


25 y O(CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

30 6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ y R² se toman juntos para formar un anillo de cinco o seis miembros.

35 7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₆C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)Het, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂ y alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a.

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, C(=O)OC₂H₅, CH₂CH(CH₃)₂,



40

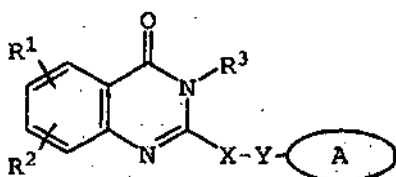
9. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en halo, OR^a, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, NO₂, N(R^a)₂, NR^aSO₂CF₃, NR^aC(=O)R^a, C(=O)OR^b, SO₂N(R^a)₂, CN, C(=O)R^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄N(R^a)₂ y N(R^a)alquilen C₁₋₄N(R^a)₂.

5 10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R³ está sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, F, CH₃, CH(CH₃)₂, OCH₃, C₆H₅, NO₂, NH₂, NHC(=O)CH₃, CO₂H y N(CH₃)CH₂CH₂N(CH₃)₂.

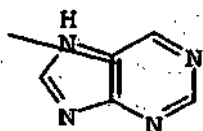
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición de acuerdo con la reivindicación 11 para uso en terapia.

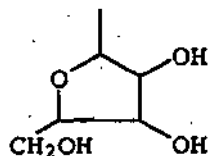
15 13. Un compuesto que tiene una fórmula estructural general



en la que A es



20 que está, o bien sin sustituir o sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en N(R^a)₂, alquilo C₁₋₃, S(alquilo C₁₋₃), OR^a, halo y



25 X se selecciona entre el grupo que consiste en CHR^b, CH₂CHR^b y CH=C(R^b);
Y se selecciona entre el grupo que consiste en S, SO o SO₂;

30 R¹ y R², independientemente, se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, halo, NHC(=O)alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, NO₂, OR^a, CF₃, OCF₃, N(R^a)₂, CN, OC(=O)R^a, C(=O)R^a, C(=O)OR^a, arilOR^b, Het, NR^aC(=O)alquilen C₁₋₃C(=O)OR^a, aril Oalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, aril OC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, C(=O)NR^aSO₂R^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₂₋₆N(R^a)₂, C(=O)-NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄CH(OR^b)CH₂N(R^a)₂, Oalquilen C₁₋₄Het, Oalquilen C₂₋₄OR^a, Oalquilen C₂₋₄NR^aC(=O)OR^a, NR^aalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, NR^aC(=O)R^a, NR^aC(=O)N(R^a)₂, N(SO₂alquilo C₁₋₄)₂, NR^a(SO₂alquilo C₁₋₄), SO₂N(R^a)₂, OSO₂CF₃, alquilen C₁₋₃arilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₆OR^b, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂, C(=O)N(R^a)₂, NHC(=O)alquilen C₁₋₃arilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, aril-Oalquilen C₁₋₃N(R^a)₂, aril OC(=O)R^b, NHC(=O)alquilen C₁₋₃-heterocicloalquilo C₃₋₈, NHC(=O)alquilen C₁₋₃Het, Oalquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^b, C(=O)alquilen C₁₋₄Het y NHC(=O)halo C₁₋₆alquilo;

40 o R¹ y R² se toman juntos para formar un componente de cadena de alquilen o de alquilenilo de 3 o 4 miembros de un anillo de 5 o 6 miembros, que contienen opcionalmente al menos un heteroátomo;

45 R³ se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alquilen C₁₋₃arilo, alquilen C₁₋₃arilo, C(=O)R^a, heteroarilo, C(=O)OR^a, C(=O)N(R^a)₂, C(=S)N(R^a)₂, SO₂R^a, SO₂N(R^a)₂, S(=O)R^a, S(=O)N(R^a)₂, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄OR^a, C(=O)NR^aalquilen C₁₋₄Het, C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄arilo opcionalmente sustituido con uno o más de halo, SO₂N(R^a)₂, N(R^a)₂, C(=O)OR^a, NR^aSO₂CF₃, CN, NO₂, C(=O)R^a, OR^a, alquilen C₁₋₄-N(R^a)₂ y Oalquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄heteroarilo, alquilen C₁₋₄-C(=O)Het,

alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a, alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄OR^a, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a y alquilen C₁₋₄Oalquilen C₁₋₄C(=O)OR^a;

R^a se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, alquilen C₁₋₃N(R^a)₂arilo, aril C₁₋₃alquilo, alquilen C₁₋₃arilo, heteroarilo, heteroaril C₁₋₃alquilo y alquilen C₁₋₃heteroarilo;

o dos grupos R^a se toman juntos para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que contiene opcionalmente al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁₋₆, arilo, heteroarilo, arilalquilo C₁₋₃, heteroaril-alquilo C₁₋₃, alquilen C₁₋₃arilo y alquilen C₁₋₃heteroarilo;

Het es un anillo heterocíclico de 5 o 6 miembros, saturado o parcialmente insaturado, que contiene al menos un heteroátomo seleccionado entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre, y opcionalmente sustituido con alquilo C₁₋₄ o C(=O)OR^a;

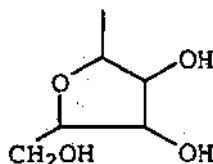
y sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de los mismos,

en donde "arilo" se define como un grupo aromático monocíclico o bicíclico; que puede estar, o bien sin sustituir o sustituido con uno o más de 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, oxígeno o azufre en un anillo aromático, y que puede estar, o bien sin sustituir o sustituido con uno o más de halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinilo y alquilsulfonilo.

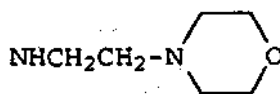
14. El compuesto de la reivindicación 13, en el que X se selecciona entre el grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃) y C(CH₃)₂.

15. El compuesto de la reivindicación 13, en el que el sistema de anillo A está sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados entre el grupo que consiste en NH₂, NH(CH₃), N(CH₃)₂, NHCH₂C₆H₅, NH(C₂H₅), Cl, F, CH₃, SCH₃, OH y



16. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R¹ y R², se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, OR^a, halo, alquilo C₁₋₆, CF₃, NO₂, N(R^a)₂, NR^aalquilen C₁₋₃N(R^a)₂ y Oalquilen C₂₋₄OR^a.

17. El compuesto de la reivindicación 15, en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente entre H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

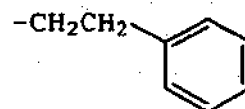
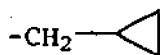
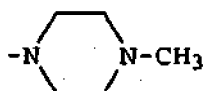
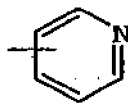
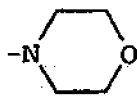
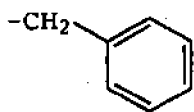


y O(CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

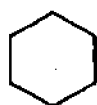
18. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R¹ y R² se toman juntos para formar un anillo de cinco o seis miembros.

19. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R³ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁₋₆, heteroarilo, cicloalquilo C₃₋₈, heterocicloalquilo C₃₋₈, C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄Het, alquilen C₁₋₄cicloalquilo, alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)alquilen C₁₋₄arilo, alquilen C₁₋₄C(=O)OR^a, alquilen C₁₋₄C(=O)N(R^a)₂, alquilen C₁₋₄C(=O)Het, alquilen C₁₋₄N(R^a)₂ y alquilen C₁₋₄NR^aC(=O)R^a.

20. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R³ se selecciona entre el grupo que consiste en OR^a, alquilo C₁₋₆, heteroarilo, NO₂, N(R^a)₂, NR^aC(=O)R^a, C(=O)OC₂H₅, CH₂CH(CH₃)₂,



y



21. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R^3 está sustituido con un sustituyente seleccionado entre el 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 , $C(=O)R^a$, alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$, Oalquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$ y $N(R^a)$ alquilen $C_{1-4}N(R^a)_2$.
- 5
22. El compuesto de la reivindicación 13, en el que R^3 está sustituido con un sustituyente seleccionado entre el grupo que consiste en Cl , F , CH_3 , $CH(CH_3)_2$, OCH_3 , C_6H_5 , NO_2 , NH_2 , $NHC(=O)CH_3$, CO_2H y $N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)_2$.
- 10
23. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
24. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 22 o una composición de acuerdo con la reivindicación 23 para uso en terapia.

15

FIGURA 1

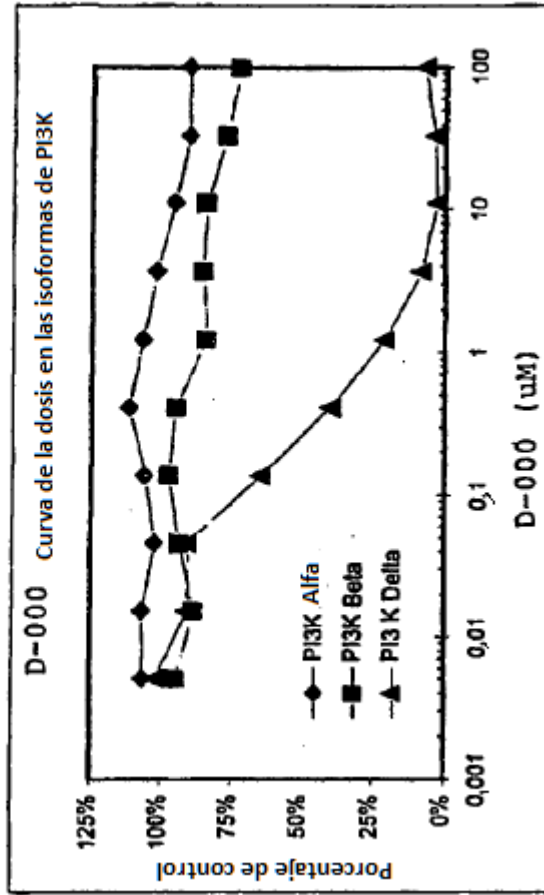


FIGURA 2

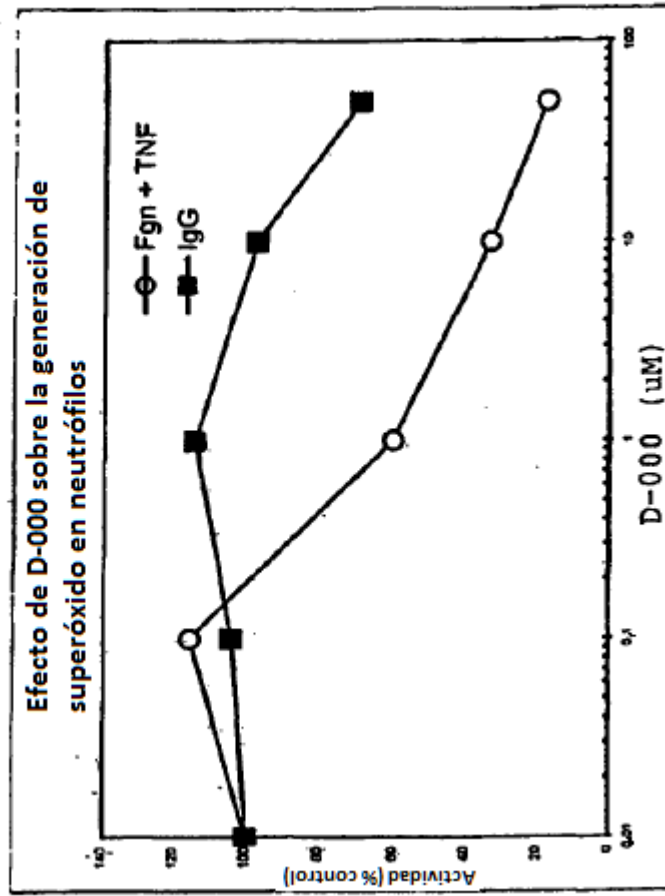


FIGURA 3

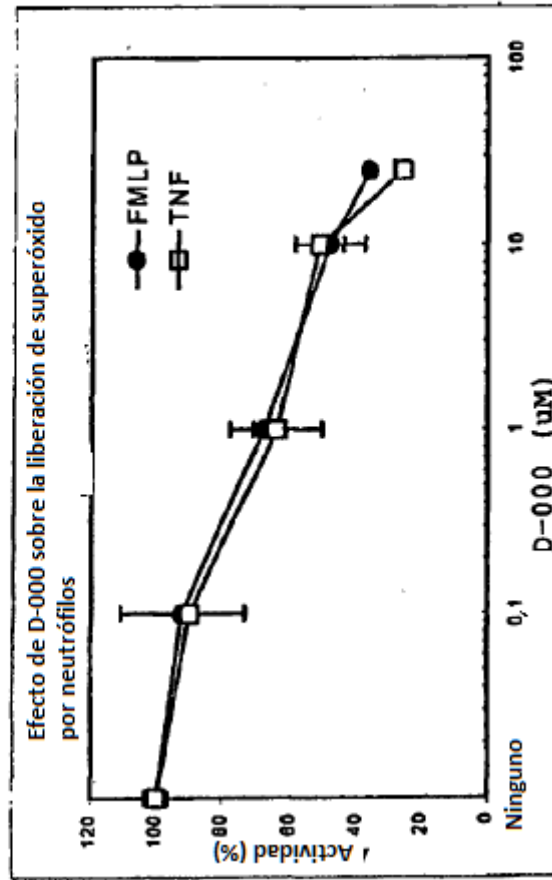


FIGURA 4

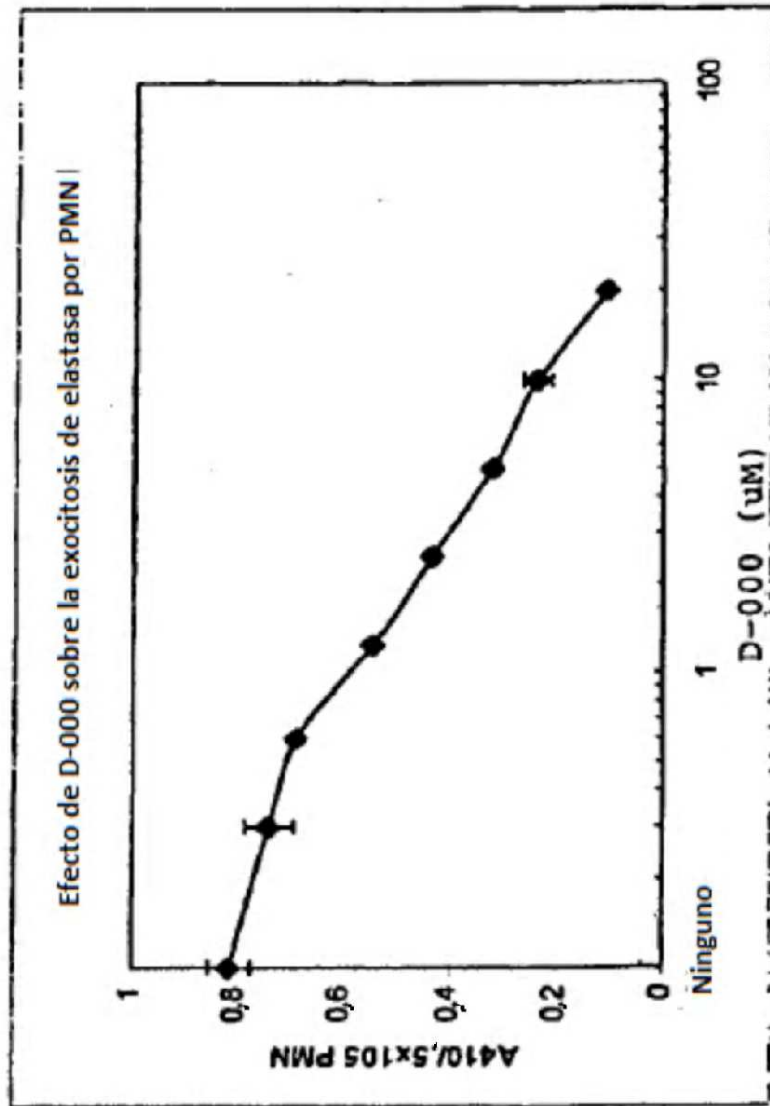


FIGURA 5

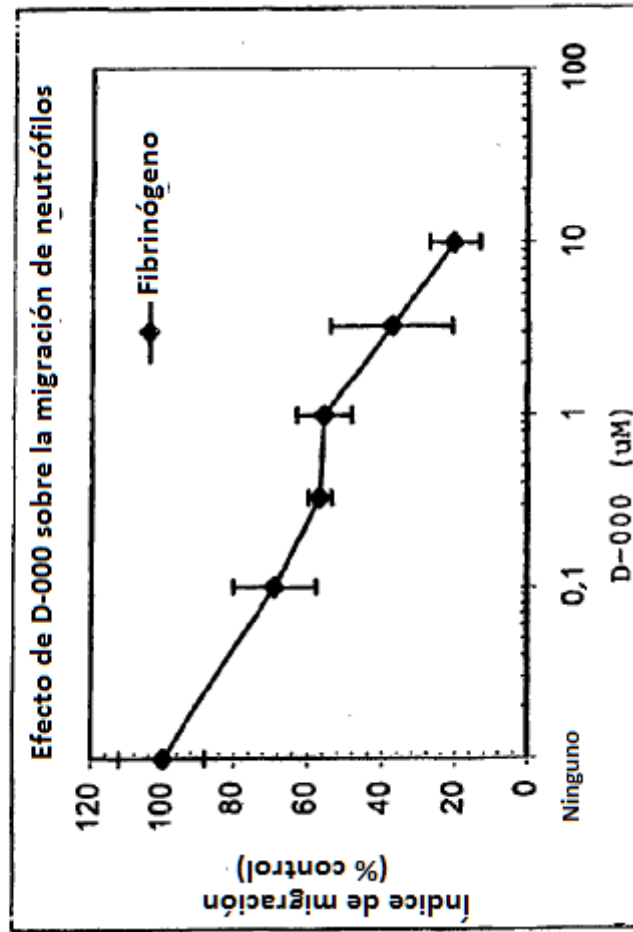


FIGURA 6

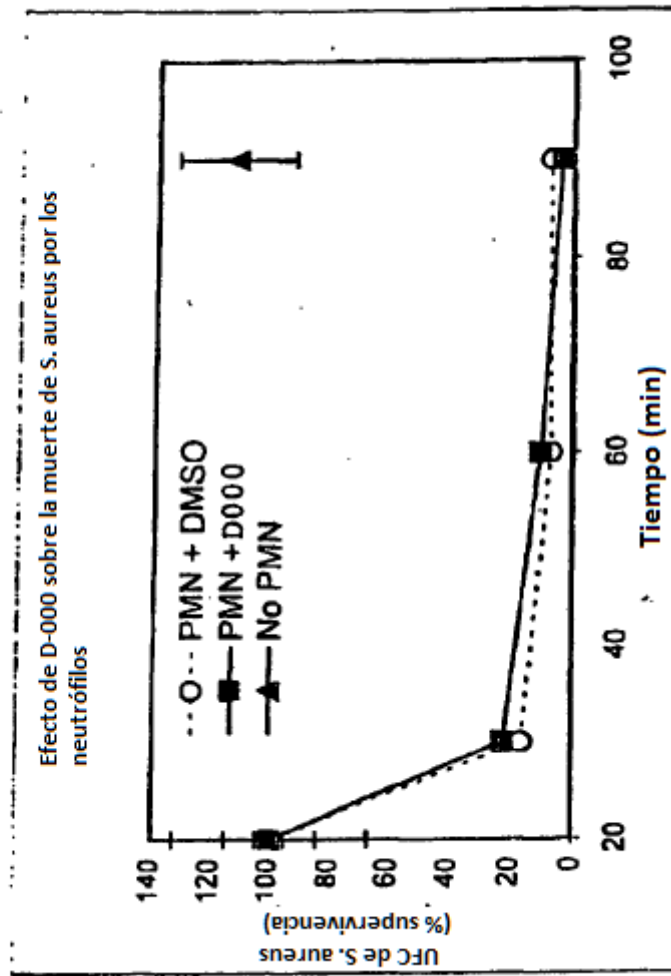


FIGURA 7

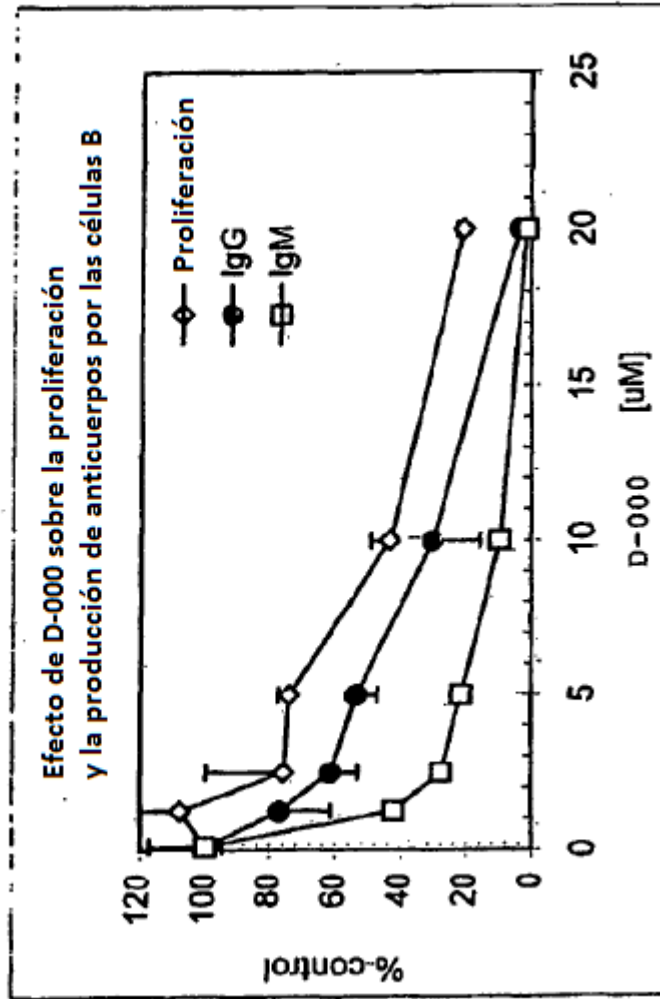
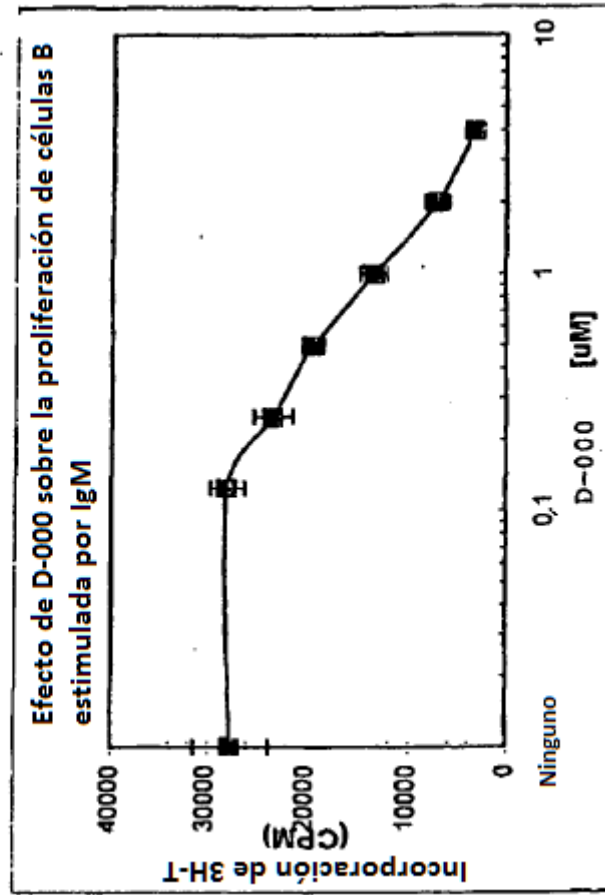


FIGURA 8



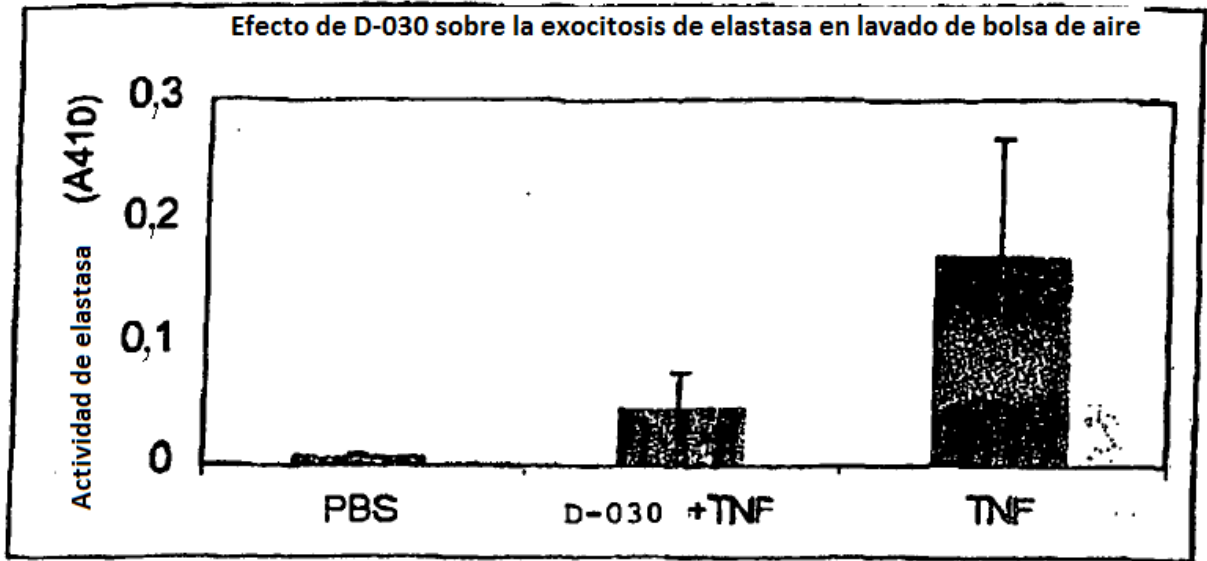


FIGURA 9