

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 109**

51 Int. Cl.:

C07D 403/12 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2013 E 13717655 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2834231**

54 Título: **Compuestos heterocíclicos y sus usos**

30 Prioridad:

04.04.2012 US 201261620270 P

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

13.07.2016

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**BUI, MINNA HUE THANH;
CUSHING, TIMOTHY D.;
GONZALEZ LOPEZ DE TURISO, FELIX;
HAO, XIAOLIN y
LUCAS, BRIAN**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 577 109 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

Compuestos heterocíclicos y sus usos

- 5 La presente invención se refiere generalmente a enzimas de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y, más particularmente, a inhibidores selectivos de la actividad de PI3K y a métodos de uso de tales materiales.

Antecedentes de la invención

- 10 La señalización celular a través de fosfoinosítidos 3'-fosforilados se ha visto implicada en una diversidad de procesos celulares, por ejemplo, transformación maligna, señalización del factor de crecimiento, inflamación e inmunidad (véase Rameh *et al.*, J. Biol Chem, 274: 8347-8350 (1999) para una revisión). La enzima responsable de la generación de estos productos de señalización fosforilados, la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa; PI3K), se identificó originalmente como una actividad asociada con oncoproteínas virales y tirosina quinasas del receptor del factor de crecimiento que fosforila el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados el 3'-hidroxilo del anillo de inositol (Panayotou *et al.*, Trends Cell Biol 2: 358-60 (1992)).

- Los niveles de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el producto primario de activación de la PI 3-quinasa, aumentan tras el tratamiento de las células con una diversidad de estímulos. Esto incluye la señalización a través de receptores para la mayoría de los factores de crecimiento y muchos estímulos inflamatorios, hormonas, neurotransmisores y antígenos, y por lo tanto la activación de las PI3K representa uno, si no el más frecuente, de los sucesos de transducción de señales asociados con la activación del receptor de la superficie celular de mamíferos (Cantley, Science 296: 1655-1657 (2002); Vanhaesebroeck *et al.*, Annu. Rev. Biochem, 70: 535-602 (2001)). Por lo tanto, la activación de la PI 3-quinasa está implicada en una amplia gama de respuestas celulares que incluyen crecimiento celular, migración, diferenciación y apoptosis (Parker *et al.*, Current Biology, 5: 577-99 (1995); Yao *et al.*, Science, 267: 2003-05 (1995)). Aunque las dianas cadena abajo de los lípidos fosforilados generados después de la activación de la PI 3-quinasa no se han caracterizado completamente, se sabe que las proteínas que contienen dominios de homología de pleckstrina y dominios de dedos de FYVE (PH) se activan cuando se unen a varios lípidos de fosfatidilinositol (Sternmark *et al.*, J Cell Sci, 112: 4175-83 (1999); Lemmon *et al.*, Trends Cell Biol, 7: 237-42 (1997)). Dos grupos de dominio PH que contienen efectores de PI3K se han estudiado en el contexto de la señalización de células inmunes, los miembros de la familia TEC de tirosina quinasa y las serina/treonina quinasas de la familia AGC. Los miembros de la familia Tec contienen dominios PH con selectividad aparente para PtdIns (3,4,5)P3 incluyen Tec, Btk, Itk y Etk. La unión de PH a PIP3 es fundamental para la actividad de tirosina quinasa de los miembros de la familia Tec (Schaeffer y Schwartzberg, Curr. Opin. Immunol. 12: 282-288 (2000)). Los miembros de la familia AGC que están regulados por la PI3K incluyen la quinasa dependiente de fosfoinosítido (PDK1), AKT (también denominado PKB) y ciertas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) y S6 quinasa. Hay tres isoformas de AKT y la activación de AKT se asocia fuertemente con la proliferación dependiente de PI3K y señales de supervivencia. La activación de AKT depende de la fosforilación de PDK1, que también tiene un dominio PH selectivo de 3 fosfoinosítido para reclutarla a la membrana en la que interactúa con AKT. Otros sustratos de PDK1 importantes son PKC y S6 quinasa (Deane y Fruman, Annu. Rev. Immunol. 22:563-598 (2004)). *In vitro*, algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) están activadas directamente por PIP3, (Burgering *et al.*, Nature, 376: 599-602 (1995)).

- En la actualidad, la familia de la enzima PI 3-quinasa se ha dividido en tres clases basándose en sus especificidades de sustrato. Las PI3K de Clase I pueden fosforilar fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-fosfato, y 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 PI y fosfatidilinositol-4-fosfato, mientras que las PI3K de Clase III solamente pueden fosforilar PI.

- La purificación inicial y la clonación molecular de la PI 3-quinasa reveló que era un heterodímero que consiste en 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 distinta, denominadas PI3K α , β , γ , y δ , cada una de las cuales consiste en una subunidad catalítica distinta de 110 kDa y una subunidad reguladora. De forma más específica, tres de las subunidades catalíticas, es decir, p110 α , p110 β y p110 δ , cada una interactúa con la misma subunidad reguladora, p85; mientras que p110 γ interactúa con una subunidad reguladora distinta, p101. Como se describe a continuación, los patrones de expresión de cada uno de estas PI3K en células y tejidos humanos también son distintos. A pesar de una gran cantidad de información que se ha acumulado en el pasado reciente sobre las funciones celulares de las PI 3-quinasas en general, las funciones desempeñadas por las isoformas individuales no se entienden completamente.

- La clonación de p110 α bovino se ha descrito. Esta proteína se identificó como 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 p110 α recombinante se asocia con p85 α , para producir una actividad de PI3K en células COS-1 transfectadas. Véase Hiles *et al.*, Cell, 70, 419-29 (1992).

- La clonación de una segunda isoforma p110 humana, denominada p110 β , se describe en Hu *et al.*, Mol Biol Cell, 13: 7677-88 (1993). Se dice que esta isoforma está asociada con p85 en células, y que se expresa de forma ubicua,

como ARNm de p110 β se ha encontrado en numerosos tejidos humanos y de ratón, así como en células endoteliales de la vena umbilical humana, leucemia de linfocitos T humanos de Jurkat, células 293 de riñón embrionario humano, fibroblastos 3T3 de ratón, células HeLa, y células de carcinoma de vejiga de rata NBT2. Tal expresión amplia sugiere que esta isoforma es muy importante en las rutas 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 una manera limitada al tejido. Se expresa a niveles elevados en linfocitos y tejidos linfoides y se ha mostrado que desempeña un papel fundamental en la señalización de PI 3-quinasa mediada en el sistema inmune (Al-Alwan *et al.* JI, 178: 2328-2335 (2007); Okkenhaug *et al.* JI, 177: 5122-5128 (2006); Lee *et al.*, PNAS, 103: 1289-1294 (2006)). También se ha mostrado que p110 δ se expresa a niveles más bajos en células de mama, melanocitos y células endoteliales (Vogt *et al.* Virology, 344: 131-138 (2006) y desde entonces se ha visto implicada en conferir propiedades migratorias selectivas a las células de cáncer de mama (Sawyer *et al.*, Cancer Res. 63: 1667-1675 (2003)). Algunos detalles con respecto a la isoforma p110 δ también se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos n.ºs 5.858.753; 5.822.910; y 5.985.589. Véase también, Vanhaesebroeck *et al.*, Proc Nat. 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 para localizar la PI 3-quinasa en la membrana plasmática mediante la interacción de su dominio SH2 restos de de tirosina fosforilados (presentes en un contexto de secuencia apropiado) en proteínas diana (Rameh *et al.*, Cell, 83: 821-30 (1995)). Se han identificado cinco isoformas de p85 (p85 α , p85 β , p55 γ , p55 α y p50 α) codificadas por tres genes. Algunas transcripciones alternativas de Pik3r1 codifican las proteínas p85 α , p55 α y p50 α (Deane y Fruman, Annu. Rev. Immunol. 22: 563-598 (2004)). p85 α se expresa de forma ubicua mientras que p85 β , se encuentra principalmente en el cerebro y tejidos linfoides (Volinia *et al.*, Oncogene, 7: 789-93 (1992)). La asociación de la subunidad p85 con las subunidades catalíticas de p110 α , β , o δ PI 3-quinasa parece ser necesaria para la actividad catalítica y la estabilidad de estas enzimas. Además, la unión de proteínas Ras también regula de forma positiva la actividad de la PI 3-quinasa.

La clonación de p110 γ reveló una complejidad más adicional dentro de la familia PI3K de enzimas (Stoyanov *et al.*, Science, 269: 690-93 (1995)). La isoforma p110 γ está muy relacionada con p110 α y p110 β (identidad de un 45-48 % en el dominio catalítico), pero como se ha señalado no hace uso de p85 como una subunidad de orientación. En su lugar, p110 γ se une a una subunidad reguladora p101 que también se une a las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas G heterotriméricas. La subunidad reguladora P101 para PI3K γ se clonó originalmente en cerdos, y el ortólogo humano identificado posteriormente (Krugmann *et al.*, J Biol Chem, 274: 17152-8 (1999)). Se sabe que la interacción entre la región N-terminal de p101 con la región N-terminal de p110 γ activa PI3K γ a través de G $\beta\gamma$. Recientemente, se ha identificado un homólogo de p101, p84 o P87^{PIKAP} (proteína adaptadora de PI3K γ de 87 kDa) que se une a p110 γ (Voigt *et al.* JBC, 281: 9977-9986 (2006), Suiire *et al.* Curr. Biol. 15: 566-570 (2005)). p87^{PIKAP} es homóloga con p101 en zonas que se unen a p110 γ y G $\beta\gamma$ y también media la activación de p110 γ cadena debajo de los receptores acoplados a la proteína G. A diferencia de p101, p87^{PIKAP} se expresa altamente en el corazón y puede ser fundamental para la función cardíaca de PI3K γ .

Un polipéptido de PI3K constitutivamente activo se describe en la publicación internacional WO 96/25488. Esta publicación desvela la preparación de una proteína de fusión quimérica en la que un fragmento de 102 restos de p85 conocida como la región inter-SH2 (iSH2) se fusiona a través de una región conectora al extremo N-terminal de p110 murino. El dominio iSH2 de p85 es capaz aparentemente de activar la actividad de PI3K de una manera comparable a p85 intacto (Klippel *et al.*, Mol Cell Biol, 14: 2675-85 (1994)).

Por lo tanto, las PI 3-quinasas se pueden definir por su identidad de aminoácidos o por su actividad. Algunos miembros adicionales de esta familia genética creciente incluyen lípidos relacionados más alejados y proteína quinasa que incluyen Vps34 TOR1, y TOR2 de *Saccharomyces cerevisiae* (y sus homólogos de mamífero tales como FRAP y mTOR), el producto genético de ataxia telangiectasia (ATR) y la subunidad catalítica de proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK). Véase, en general, Hunter, Cell, 83: 1-4 (1995).

La PI 3-quinasa también está implicada en una serie de aspectos de activación de leucocitos. Se ha demostrado que una actividad de PI 3-quinasa asociada a p85 está asociada físicamente con el dominio citoplásmico de CD28, que es una molécula coestimuladora importante para la activación de los linfocitos T como respuesta al antígeno (Pages *et al.*, Nature, 369: 327-29 (1994); Rudd, Immunity, 4: 527-34 (1996)). La activación de los linfocitos T a través de CD28 reduce el umbral de activación por antígeno y aumenta la magnitud y duración de la respuesta proliferativa. Estos efectos están relacionados con aumentos en la transcripción de un número de genes incluyendo 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 modo que ya no pueda interactuar con PI 3-quinasa conduce a un fallo para iniciar la producción de IL2, lo que sugiere un papel crítico para la PI 3-quinasa en la activación de linfocitos T.

Algunos inhibidores específicos (WO 2012/003271) contra miembros individuales de una familia de enzimas proporcionan herramientas muy valiosas para descifrar las funciones de cada enzima. Dos compuestos, LY294002 y wortmanina, se han usado ampliamente como inhibidores de PI 3-quinasa. Estos compuestos, sin embargo, son inhibidores de PI3K no específicos, ya que no distinguen entre los cuatro miembros de las PI 3-quinasas de Clase I.

Por ejemplo, los valores de CI_{50} de wortmanina contra cada uno de las diversas PI 3-quinasa de Clase I están en el intervalo de 1-10 nM. De forma análoga, los valores de CI_{50} para LY294002 contra cada una de estas PI 3-quinasa es de aproximadamente 1 μ M (Fruman *et al.*, Ann Rev Biochem, 67: 481-507 (1998)). Por lo tanto, la utilidad de estos compuestos en el estudio de las funciones de las PI 3-quinasa de Clase I individuales es limitada.

5 Basándose en estudios que usan wortmanina, existen evidencias de que la función de la PI 3-quinasa también es necesaria para algunos aspectos de la señalización de leucocitos a través receptores acoplados a la proteína G (Thelen *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 91: 4960-64 (1994)). Además, se ha mostrado que wortmanina y LY294002 bloquean la migración de neutrófilos y la liberación de superóxido. Sin embargo, puesto que estos compuestos no distinguen entre las diversas isoformas de PI3K, a partir de estos estudios no queda claro qué isoforma o isoformas de PI3K en particular están implicadas en estos fenómenos y qué funciones realizan las diferentes enzimas PI3K de Clase I tanto en tejidos normales como enfermos en general. La coexpresión de varias isoformas de PI3K en la mayoría de los tejidos ha frustrado los esfuerzos para separar las actividades de cada enzima hasta hace poco.

15 La separación de las actividades de las diversas isozimas PI3K ha avanzado recientemente con el desarrollo de ratones manipulados genéticamente que permitieron el estudio de ratones con desactivación genética y con activación genética de quinasa muerta específicas de isoforma y el desarrollo de inhibidores más selectivos para algunas de las diferentes isoformas. Se han generado ratones con desactivación genética p110 α y p110 β y ambos son letales embrionarios y se puede obtener poca información a partir de estos ratones en cuanto a la expresión y función de p110 alfa y beta (Bi *et al.* Mamm. Genome, 13: 169-172 (2002); Bi *et al.* J. Biol. Chem. 274: 10963-10968 (1999)). Más recientemente, se generaron ratones con activación genética de quinasa muerta p110 α con una sola mutación puntual en el motivo DFG del bolsillo de unión de ATP (p110 α D⁹³³) que deteriora la actividad de quinasa, pero conserva la expresión de quinasa p110 α mutante. Al contrario que los ratones con desactivación genética, el enfoque de activación genética conserva la estequiometría compleja de la señalización, funciones de andamios e imita a los enfoques de molécula pequeña de manera más realista que los ratones con desactivación genética. Del mismo modo que los ratones p110 α KO, los ratones homocigotos p110 α D^{933A} son letales embrionarios. Sin embargo, los ratones heterocigotos son viables y fértiles pero presentan señalización severamente debilitada a través de proteínas de sustrato receptor de insulina (IRS), mediadores fundamentales de insulina, factor 1 de crecimiento similar a la insulina y acción de la leptina. La respuesta defectuosa a estas hormonas conduce a hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, hiperpagia, aumento de la adiposidad y reducción del crecimiento general en heterocigotos (Foukas, *et al.*, Nature, 441: 366-370 (2006)). Estos estudios revelaron un papel no redundante, definido para p110 α como un intermedio en la señalización de IGF-1, insulina y leptina que no está sustituido por otras isoformas. Los inventores tendrán que esperar a la descripción de la activación genética de la quinasa muerta p110 α para comprender mejor la función de esta isoforma (los ratones se han preparado pero aún no se ha publicado; Vanhaesebroeck).

Se han generado ratones con desactivación genética de p110 γ y activación genética de quinasa muerta y en general muestran fenotipos similares y ligeros con defectos primarios en la migración de células del sistema inmune innato y un defecto en el desarrollo tímico de los linfocitos T (Li *et al.*, Science, 287: 1046-1049 (2000), Sasaki *et al.*, Science, 287: 1040-1046 (2000), Patrucco *et al.*, Cell, 118: 375-387 (2004)).

Al igual que p110 γ , se han preparado ratones con desactivación genética de PI3K delta y activación genética de quinasa muerta y son viables con fenotipos viables y ligeros. Los ratones con activación genética mutantes p110 δ D^{910A} demostraron un papel importante para delta en el desarrollo y la función de linfocitos B, con linfocitos B y células CD5 + B1 de la zona marginal casi indetectables, y señalización del receptor de antígeno de linfocitos B y T (Clayton *et al.*, J. Exp. Med. 196: 753-763 (2002); Okkenhaug *et al.*, Science, 297: 1031-1034 (2002)). Los ratones p110 δ D^{910A} se han estudiado ampliamente y han dilucidado el papel diverso que desempeña delta en el sistema inmune. Las respuestas inmunes dependientes de linfocitos T e independientes de linfocitos T están seriamente atenuadas en p110 δ D^{910A} y la secreción de TH1 (INF- γ) y citoquina TH2 (IL-4, IL-5) están afectadas (Okkenhaug *et al.*, J. Immunol 177: 5122 -5128 (2006)). Un paciente humano con una mutación en p110 δ también se ha descrito recientemente. Un niño taiwanés con una inmunodeficiencia de linfocitos B primarios y una gamma-hipoglobulinemia de etiología previamente desconocida presentaba una única sustitución de pares de bases, m.3256G para A en el codón 1021 en el exón 24 del p110 δ . Esta mutación dio como resultado una sustitución de aminoácido en sentido erróneo (E a K) en el codón 1021, que se encuentra en el dominio catalítico altamente conservado de la proteína p110 δ . El paciente no tiene otras mutaciones identificadas y su fenotipo es coherente con la deficiencia de p110 δ en ratones de acuerdo con lo que se ha estudiado. (Jou *et al.*, Int. J. Immunogenet 33: 361-369 (2006)).

Algunos compuestos de molécula pequeña selectivos de isoforma variable se han desarrollado con éxito variable para todas las isoformas de PI3 quinasa de Clase I (Ito *et al.*, J. Pharm Exp Therapeut, 321: 1-8 (2007)). Algunos inhibidores para alfa son deseables porque se han identificado mutaciones en p110 α en varios tumores sólidos; por ejemplo, una mutación de amplificación de alfa se asocia con un 50 % de cáncer de ovario, cuello uterino, pulmón y mama y una mutación de activación se ha descrito en más de 50 % de cánceres de intestino y un 25 % de cánceres de mama (Hennessy *et al.*, Nature Reviews , 4: 988-1004 (2005)). Yamanouchi ha desarrollado un compuesto, YM-024, que inhibe alfa y delta de forma equipotente y es de 8 y 28 veces más selectivo con respecto a beta y gamma respectivamente (Ito *et al.*, J. Pharm. Exp. Therapeut, 321: 1-8 (2007)).

P110 β está implicada en la formación de trombos (Jackson *et al.*, Nature Med 11: 507-514 (2005)) y se cree que algunos inhibidores de molécula pequeña específicos para esta isoforma se han concebido para indicación que implica trastornos de coagulación (TGX-221: 0,007 μ M en beta; selectiva 14 veces con respecto a delta, y más de 500 veces más selectivo con respecto a gamma y alfa) (Ito *et al.*, J. Pharm. Exp. Therapeut, 321: 1-8 (2007)).

Varios grupos están desarrollando algunos compuestos selectivos para p110 γ como agentes inmunosupresores para enfermedad autoinmune (Rueckle *et al.*, Nature Reviews, 5: 903-918 (2006)). Es de destacar que se ha demostrado que AS 605240 es eficaz en un modelo de ratón de artritis reumatoide (Camps *et al.*, Nature Medicine, 11: 936-943 (2005)) y que retrasa el inicio de la enfermedad en un modelo de lupus sistémico eritematoso (Barber *et al.*, Nature Medicine, 11: 933-935 (2005)).

Recientemente también se han descrito algunos inhibidores selectivos de delta. Los compuestos más selectivos incluyen los inhibidores de purina quinazolinona (PIK39 e IC87114). IC87114 inhibe p110 δ en el rango nanomolar elevado (tres dígitos) y tiene una selectividad superior a 100 veces frente a p110 α , es 52 veces más selectivo frente a p110 β pero carece de selectividad frente a p110 γ (aprox. 8 veces). No muestra ninguna actividad frente a ninguna proteína quinasa sometida a ensayo (Knight *et al.*, Cell, 125: 733-747 (2006)). Usando compuestos selectivos para delta o ratones manipulados genéticamente (p110 δ ^{D910A}) se demostró además de desempeñar un papel fundamental en la activación de los linfocitos B y T, delta también está parcialmente implicado en la migración de neutrófilos y en el estallido respiratorio de neutrófilos estimulado y conduce a un bloqueo parcial de la desgranulación de mastocitos mediada por antígeno-IgE (Condliffe *et al.*, Blood, 106: 1432-1440 (2005); Ali *et al.*, Nature, 431: 1007-1011 (2002)). Por lo tanto p110 δ está emergiendo como un importante mediador de muchas respuestas inflamatorias fundamentales que también se sabe que participan en afecciones inflamatorias anómalas, que incluyen, pero no se limitan a enfermedad autoinmune y alergia. Para apoyar esta idea, existe un creciente cuerpo de datos de validación de diana de p110 δ a partir de estudios que usan tanto herramientas genéticas como agentes farmacológicos. Por lo tanto, usando el compuesto IC 87114 selectivo de delta y ratones p110 δ ^{D910A}, Ali *et al.*, (Nature, 431: 1007-1011 (2002)) han demostrado que delta desempeña un papel fundamental en un modelo murino de enfermedad alérgica. En ausencia de delta funcional, la anafilaxis cutánea pasiva (PCA) se reduce de forma significativa y se puede atribuir a una reducción de la activación de mastocitos inducida por alérgeno-IgE y desgranulación. Además, se ha demostrado que la inhibición de delta con IC 87114 mejora de forma significativa la inflamación y la enfermedad en un modelo murino de asma usando inflamación de las vías respiratorias inducida por ovoalbúmina (Lee *et al.*, FASEB, 20: 455-465 (2006)). Estos datos que utilizan el compuesto se corroboraron en ratones mutantes para p110 δ ^{D910A} usando el mismo modelo de inflamación de las vías respiratorias alérgica con un grupo diferente (Nashed *et al.*, Eur. J. Immunol. 37: 416-424 (2007)).

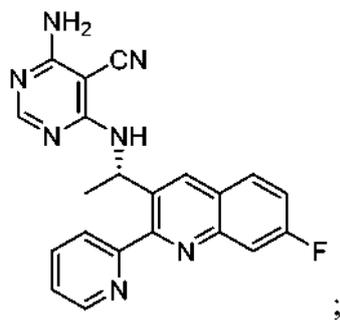
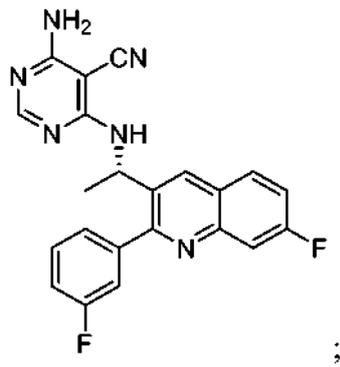
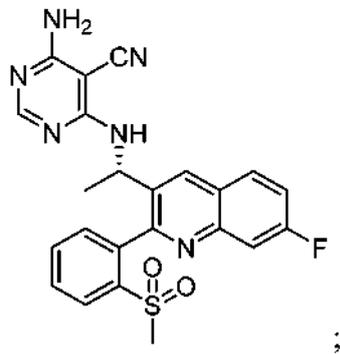
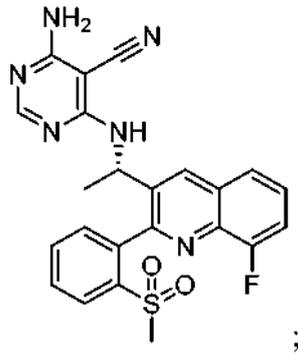
Existe una necesidad de caracterización adicional de la función de PI3K δ en configuraciones inflamatorias y autoinmunes. Por otra parte, la comprensión de los inventores de PI3K δ requiere una elaboración adicional de las interacciones estructurales de p110 δ , tanto con su subunidad reguladora como con otras proteínas en la célula. También sigue habiendo una necesidad de inhibidores más potentes y selectivos o específicos de PI3K delta, para evitar una toxicología potencial asociada con la actividad de en isoenzimas p110 alfa (señalización de insulina) y beta (activación de plaquetas). En particular, algunos inhibidores selectivos o específicos de PI3K δ son deseables para explorar el papel de esta isoenzima adicionalmente y para el desarrollo de productos farmacéuticos superiores para modular la actividad de la isoenzima.

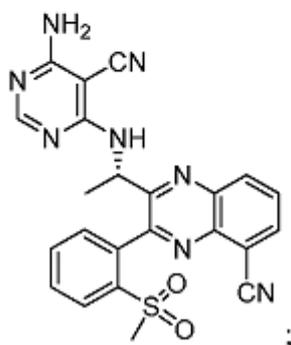
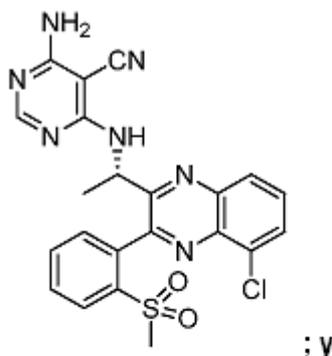
Sumario

La presente invención comprende nuevos compuestos que tienen propiedades y actividad biológica mejoradas en PI3K δ humana.

Descripción detallada

Un aspecto de la invención se refiere a compuestos que tienen las estructuras





o cualquier sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar afecciones o trastornos mediados por PI3K.

En ciertas realizaciones, la afección o trastorno mediados por PI3K se selecciona entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y que enfermedades autoinmunes. En otras realizaciones, la afección o trastorno mediados por PI3K se selecciona entre enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, apoplejía, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolia, embolia pulmonar, enfermedades trombolíticas, isquemia arterial aguda, oclusiones trombóticas periféricas, y enfermedad arterial coronaria. En otras realizaciones más, la afección o trastornos mediados por PI3K se selecciona entre cáncer, cáncer de colon, glioblastoma, carcinoma endometrial, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma de tiroides, linfoma celular, trastornos linfoproliferativas, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón de células escamosas, glioma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, y leucemia. En otra realización más, la afección o trastorno mediados por PI3K se selecciona entre diabetes del tipo II diabetes. En otras realizaciones más, la afección o trastornos mediados por PI3K se seleccionan entre enfermedades respiratorias, bronquitis, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

20 Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias o enfermedades autoinmunes que comprenden la etapa de administrar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomielitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad, que comprende la etapa de administrar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores.

35 Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de cánceres que están mediados, dependen de un están asociados con la actividad de con p110δ, que comprende la etapa de administrar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores.

40 Otro aspecto de la invención se refiere al tratamiento de cánceres seleccionados entre leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico, enfermedades mieloproliferativas, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, linfoma no Hodgkins, linfoma de linfocitos B, tumores

sólidos y cáncer de mama, que comprende la etapa de administrar un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente y un diluyente vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente como un medicamento.

15 Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones mencionadas anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes.

Los compuestos de la presente invención pueden tener en general varios centros asimétricos y por lo general se representan en forma de mezclas racémicas. La presente invención pretende incluir mezclas racémicas, mezclas parcialmente racémicas y enantiómeros y diastereómeros separados.

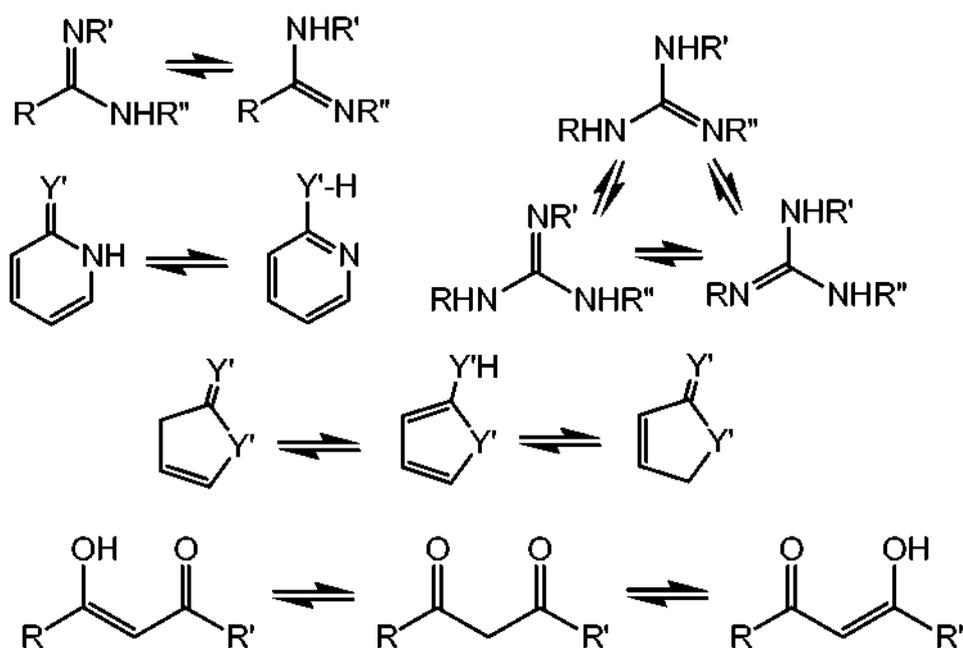
20 "Sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sal preparada con medios convencionales, y son bien conocidas por los expertos en la materia. Las "sales farmacológicamente aceptables" incluyen sales básicas de ácidos inorgánicos y orgánicos, que incluyen, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido málico, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico y similares. Cuando los compuestos de la invención incluyen una función ácida tal como un grupo carboxi, entonces los expertos en la materia conocen bien algunos pares de cationes farmacéuticamente adecuados para el grupo carboxi incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, amonio, amonio cuaternario y similares. Para ejemplos adicionales de "sales farmacológicamente aceptables", véase *infra* y Berge *et al.*, J. Pharm. Sci. 66: 1 (1977).

30 Por lo general "grupo saliente" se refiere a grupos que se pueden desplazar fácilmente por nucleófilo, tal como un nucleófilo de amina, un tiol o un alcohol. Tales grupos salientes se conocen bien en la técnica. Algunos ejemplos de tales grupos salientes incluyen, pero no se limitan a, N-hidroxisuccinimida, N-hidroxibenzotriazol, haluros, triflatos, tosilatos y similares. Algunos grupos salientes preferentes se indican en el presente documento cuando sea apropiado. Por lo general "grupo protector" se refiere a grupos bien conocidos en la técnica que se usan para evitar que algunos grupos reactivos seleccionados, tales como carboxi, amino, hidroxí, mercapto y similares, experimenten reacciones indeseadas, tales como nucleófilas, electrófilas, oxidación, reducción y similares. Algunos grupos protectores preferentes se indican en el presente documento cuando sea apropiado. Algunos ejemplos de grupos protectores de amino incluyen, pero no se limitan a, aralquilo, aralquilo sustituido, cicloalquenilalquilo y cicloalqueni alquilo sustituido, alilo, alilo sustituido, acilo, alcoxicarbonilo, aralcoxicarbonilo, sililo y similares. Algunos ejemplos de aralquilo incluyen, pero no se limitan a, bencilo, orto-metilbencilo, tritilo y benzhidrilo, que puede estar opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo, alcoxi, hidroxí, nitro, acilamino, acilo y similares, y sales, tales como sales de fosfonio y amonio. Algunos ejemplos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, indanilo, antracenoilo, 9-(9-fenilfluorenilo), fenantrenilo, durenilo y similares. Algunos ejemplos de radicales cicloalquenilalquilo o cicloalquilenilalquilo sustituido, que tienen preferentemente 6-10 átomos de carbono, incluyen, pero no se limitan a, ciclohexenil metilo y similares. Algunos grupos acilo, alcoxicarbonilo y aralcoxicarbonilo adecuados incluyen benciloxicarbonilo, t-butoxicarbonilo, isobutoxicarbonilo, benzoílo, benzoilo sustituido, butirilo, acetilo, trifluoroacetilo, tricloro acetilo, ftaloílo y similares. Una mezcla de grupos protectores se pueden usar para proteger el mismo grupo amino, tal como un grupo amino primario se puede proteger tanto con un grupo aralquilo como con un grupo aralcoxicarbonilo. Algunos grupos protectores de amino también pueden formar un anillo heterocíclico con el nitrógeno al que están unidos, por ejemplo, 1,2-bis(metilen)benceno, ftalimidilo, succinimidilo, maleimidilo y similares y en el que estos grupos heterocíclicos pueden incluir adicionalmente la unión a anillos de arilo y cicloalquilo. Además, los grupos heterocíclicos pueden estar mono-, di- o tri-sustituidos, tal como nitroftalimidilo. Algunos grupos amino también se pueden proteger frente a reacciones indeseadas, tales como oxidación, a través de la formación de una sal de adición, tal como clorhidrato, ácido toluenosulfónico, ácido trifluoroacético y similares. muchos de los grupos protectores de amino también son adecuados para protección de grupos carboxi, hidroxí y mercapto. Por ejemplo, grupos aralquilo. Algunos grupos alquilo también son grupos adecuados para proteger grupos hidroxí y mercapto, tal como terc-butilo. Algunos grupos protectores de sililo son átomos de silicio opcionalmente sustituido con uno o más grupos alquilo, arilo y aralquilo. Algunos grupos protectores de sililo adecuados incluyen, pero no se limitan a, trimetilsililo, trietilsililo, triisopropilsililo, terc-butildimetilsililo, dimetilfenilsililo, 1,2-bis(dimetilsilil)benceno, 1,2-bis(dimetilsilil)etano y difenildimetilsililo. La sililación de un grupo amino proporciona grupos mono- o di-sililamino. La sililación de compuestos de aminoalcohol puede conducir a un derivado de N,N,O-trisililo. La retirada de la función sililo de una función silil éter se consigue fácilmente por tratamiento con, por ejemplo, un reactivo de hidróxido metálico o fluoruro de amonio, ya sea como una etapa de reacción separada o *in situ* durante una reacción con el grupo alcohol. Algunos agentes de sililación adecuados son, por ejemplo, cloruro de trimetilsililo, cloruro de terc-butildimetilsililo, cloruro de fenildimetilsililo, cloruro de difenilmetil sililo o sus productos de combinación con imidazol o

DMF. Los expertos en la materia conocen bien algunos métodos para sililación de aminas y retirada de grupos protectores de sililo. Los expertos en la técnica de la química orgánica también conocen bien algunos métodos de preparación de estos derivados de amina de los correspondientes aminoácidos, amidas de aminoácido o ésteres de aminoácido incluyendo química de aminoácido/éster de aminoácido o aminoalcohol.

Algunos grupos protectores se retiran en condiciones que no afectan a la parte restante de la molécula. Estos métodos se conocen bien en la técnica e incluyen hidrólisis ácida, hidrogenólisis y similares. Un método preferente implica la retirada de un grupo protector, tal como retirada de un grupo benciloxycarbonilo mediante hidrogenólisis utilizando paladio sobre carbono en un sistema disolvente adecuado tal como un alcohol, ácido acético, y similares o mezclas de los mismos. Un grupo protector de t-butoxicarbonilo se puede retirar utilizando un ácido inorgánico orgánico, tal como HCl o ácido trifluoroacético, en un sistema disolvente adecuado, tal como dioxano o cloruro de metileno. La sal de amino resultante se puede neutralizar fácilmente para producir la amina libre. El grupo protector de carboxi, tal como metilo, etilo, bencilo, terc-butilo, 4-metoxifenilmetilo y similares, se puede retirar en condiciones de hidrólisis e hidrogenólisis bien conocidas por los expertos en la materia.

Se debería indicar que los compuestos de la invención pueden contener grupos que pueden existir en formas tautoméricas, tales como grupos amidina y guanidina cíclicas y acíclicas, grupos heteroarilo sustituido con heteroátomo (Y' = O, S, NR), y similares, que se ilustran en los siguientes ejemplos:



y aunque una forma se nombre, describa, presente y/o reivindique en el presente documento, se pretende que todas las formas tautoméricas estén incluidas de forma inherente bajo tal nombre, descripción, presentación y/o reivindicación.

Los profármacos de los compuestos de la presente invención donde se contemplan en esta invención. Un profármaco es un compuesto activo o inactivo que se modifica químicamente a través de acción fisiológica *in vivo*, tal como hidrólisis, metabolismo y similares, en un compuesto de la presente invención después de administración del profármaco a un paciente. La idoneidad y técnicas implicadas en la preparación y uso de profármacos son bien conocidas por los expertos en la materia. Para un discusión general de profármacos que implican ésteres véase Svensson y Tunek Drug Metabolism Reviews 165 (1988) y Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985). Algunos ejemplos de un anión carboxilato enmascarado incluyen una diversidad de ésteres, tales como alquilo (por ejemplo, metilo, etilo), cicloalquilo (por ejemplo, ciclohexilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo, p-metoxibencilo), y alquilcarboniloxialquilo (por ejemplo, pivaloiloximetilo). Algunas aminas se han enmascarado como derivados sustituidos con arilcarboniloximetilo que se extinguen con esterasas *in vivo* liderando el fármaco libre y formaldehído (Bungaard J. Med. Chem. 2503 (1989)). Además, algunos fármacos que contienen un grupo NH ácido, tal como imidazol, imida, indol y similares, se han enmascarado con grupos N-aciloximetilo (Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985)).

Algunos grupos hidroxí se han enmascarado como ésteres y éteres. El documento EP 039,051 (Sloan y Little, 4/11/81) desvela profármacos de base de Mannich y ácido hidroxámico, su preparación y uso.

La memoria descriptiva y las reivindicaciones contienen listados de especies en los que se usa la expresión "seleccionado entre . . . y . . ." y "es . . . o . . ." (en ocasiones denominados grupos de Markush). Cuando estas expresiones se usan en la presente solicitud, a menos que se indique de otro modo, se hace referencia a que incluyen el grupo como un conjunto, o cualquier miembro individual del mismo, o cualquier subgrupo del mismo. El uso de esta expresión es simplemente para fines simbólicos y en ningún modo pretende ser limitante de la retirada de elementos individuales o subgrupos si fuera necesario.

Experimental

Se usan las siguientes abreviaturas:

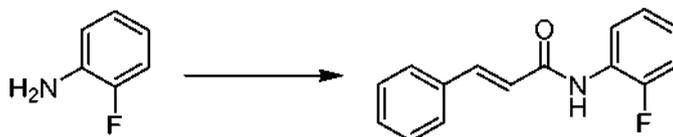
ac. -	acuoso
BINAP -	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
cond -	concentrado
15 DCM	diclorometano
DMF -	<i>N,N</i> -dimetilformamida
Et ₂ O -	éter dietílico
EtOAc -	acetato de etilo
EtOH -	alcohol etílico
20 h -	hora(s)
min -	minutos
MeOH -	alcohol metílico
ta	temperatura ambiente
satd -	saturado
25 THF -	tetrahidrofurano

General

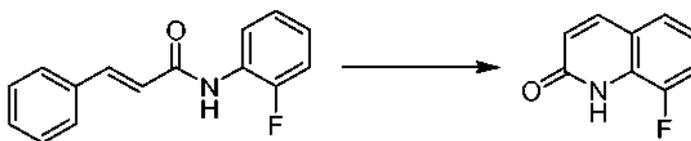
Los reactivos y disolventes usados a continuación se pueden obtener a partir de fuentes comerciales. Los espectros de RMN ¹H se registraron en un espectrómetro RMN Bruker a 400 MHz y 500 MHz. Los picos significativos se tabulan en el orden: multiplicidad (s, singlete; d, duplete; t, triplete; c, cuadruplete; m, multiplete; s a, singlete ancho), constante(s) de acoplamiento en Hercios (Hz) y número de protones. Los resultados de espectrometría de masas se informan como la proporción de masa con respecto a la carga, seguido de la abundancia relativa de cada ión (entre paréntesis el análisis de espectrometría de masas de ionización con Electronebulización (ESI) se realizó en un espectrómetro de masas con electronebulización LC/MSD de la serie Agilent 1100. Todos los compuestos se pudieron analizar en el modo ESI positivo usando acetonitrilo:agua con ácido fórmico al 0,1 % como el disolvente de administración. La HPLC analítica en fase inversa se realizó usando una serie Agilent 1200 en una columna de 5 μm (4,6 x 150 mm) Agilent Eclipse XDB-C18 como la fase estacionaria y eluyendo con acetonitrilo:H₂O con TFA al 0,1 %. La HPLC semi-prep en fase inversa se realizó usando una columna Agilent 1100 Series en una columna Phenomenex Gemini™ C18 de 10 μm (250 x 21,20 mm) como la fase estacionaria y que eluyendo con acetonitrilo:H₂O con TFA al 0,1 %. Los compuestos quirales se purifican usando gradiente de Isopropanol/Hexano, columna AD. La asignación de la quiralidad se basa en los datos bioquímicos.

Ejemplo 1: Preparación de 4-amino-6-(((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metil-sulfonil)fenil)-3-quinolinil)etil)amino)-5-pirimidincarbonitrilo

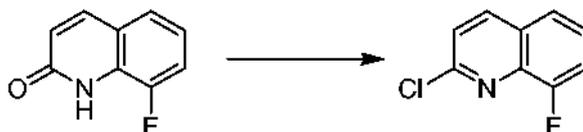
N-(2-fluorofenil)cinamamida



A una solución de 2-fluoroanilina (25,0 g, 225 mmol) y carbonato potásico (47 g, 337 mmol) en agua (112 ml) y acetona (45 ml) a 0 °C se añadió cloruro de cinamoílo (37,0 g, 225 mmol, 1 equiv.) en acetona (45 ml) durante 2 h. La reacción se agitó durante 1 h a 0 °C, y se inactivó en 200 ml de agua con hielo. El sólido cristalino de color blanco se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó al aire durante 2 h, a continuación se lavó con 400 ml de hexanos. El sólido se secó al vacío durante una noche para proporcionar N-(2-fluorofenil)cinamamida (56 g, rendimiento de un 103 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,49 (t a, *J* = 7,8 Hz, 1 H), 7,80 (d, *J* = 15,3 Hz, 1 H), 7,57 (m, 3H), 7,41 (m, 3 H), 7,17 (m, 3 H), 6,61 (d, *J* = 15,6 Hz, 1 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 242,1 (M + 1).

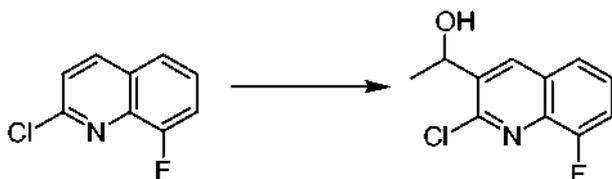
8-fluoroquinolin-2(1H)-ona

5 N-(2-Fluorofenil)cinamamida (10,5 g, 44 mmol) se disolvió en clorobenceno (60 ml) y se añadió tricloruro de aluminio (29,0 g, 218 mmol, 5 equiv.). La reacción se calentó a 125 °C durante 3 h y que a continuación se enfrió a ta durante 45 min. La reacción se vertió en 300 g de hielo con agitación, produciendo un sólido de color castaño. El sólido se filtró y se lavó con 100 ml de agua y 3 x 100 ml de hexanos y se secó a alto vacío. El sólido se extrajo con 1 l de DCM y se filtró para retirar los productos secundarios insolubles. El disolvente se retiró al vacío para proporcionar 8-fluoroquinolin-2(1H)-ona. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 10,95 (s a, 1H), 7,77 (dd, J = 9,8, 1,6 Hz, 1 H), 7,35 (d, J = 7,8 Hz, 1 H), 7,27 (ddd, J = 10,2, 7,8, 1,2 Hz, 1 H), 7,14 (td, J = 8,0, 5,1 Hz, 1 H), 6,76 (d, J = 9,4 Hz, 1 H).

2-cloro-8-fluoroquinolina

15 8-Fluoroquinolin-2(1H)-ona (26,0 g, 159 mmol) se suspendió con tricloruro de fosforilo (163 ml, 1,73 mol, 11 equiv.) y se calentó a 125 °C durante 2 h. La reacción se enfrió a ta y se vertió en 1,2 l de agua con hielo con agitación vigorosa. Cuando la mezcla se había enfriado a ta, el sólido de color naranja se filtró y se lavó con agua y se secó al vacío durante una noche para proporcionar 27 g de material en bruto. El material en bruto se recrystalizó en hexanos por disolución en ~700 ml de hexanos a reflujo y retirando por decantación del alquitrán residual. La solución de hexano se enfrió a 0 °C y la 2-cloro-8-fluoroquinolina precipitada se filtró. Las aguas madre se concentraron al vacío y se cristalizaron en hexanos para obtener una segunda cosecha de 2-cloro-8-fluoroquinolina (21,3 g, rendimiento total de un 74 %).

20 RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,14 (dd, J = 8,6, 1,2 Hz, 1 H), 7,62 (d a, 1H), 7,52 (td, J = 7,8, 4,7 Hz, 1 H), 7,45 (m, 2 H).

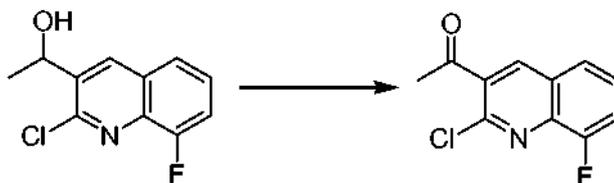
1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol

30 2-Cloro-8-fluoroquinolina (5,00 g, 27,5 mmol) se disolvió en THF (60 ml) y se enfrió a -78 °C. A esta solución se añadió diisopropilamida de litio recién preparada y valorada (solución 1 M en THF, 30 ml, 30 mmol, 1,1 equiv.) durante 5 min. La reacción se dejó en agitación a -78 °C durante 20 min, tiempo tras el que se añadió acetaldehído (2,3 ml, 41,3 mmol, 1,5 equiv.) mediante una jeringa durante 30 segundos (exotérmico). Después de 30 min a -78 °C, la reacción se interrumpió con solución saturada de NH₄Cl al 50 % y se diluyó con EtOAc. Las fases se separaron y se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, y se filtraron. La mezcla de reacción en bruto se depositó en 30 g de gel de sílice y se pasó a través de un lecho de 60 g de gel de sílice, eluyendo con hexanos:EtOAc a 8:2. Las fracciones que contenían el producto y un regioisómero de elución próxima (segundo) se recogieron. Las fracciones se concentraron y el sólido en bruto se suspendió en 140 ml de 9:1 de hexanos:EtOAc a reflujo durante 30 min. Después de enfriar a ta, el sólido se filtró y se lavó con una pequeña cantidad de de hexanos:EtOAc a 9:1 en frío para proporcionar el 1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol puro (3,1 g, 13,7 mmol, rendimiento de un 50 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,43 (s a, 1 H), 7,64 (td, J = 7,8, 5,1 Hz, 1 H), 7,41 (ddd, J = 10,2, 7,4, 1,2 Hz, 1 H), 5,39 (cdd, J = 6,3, 3,9, 0,8 Hz, 1 H), 2,22 (d, J = 3,9 Hz, 1 H), 1,62 (d, J = 6,3 Hz, 3 H).

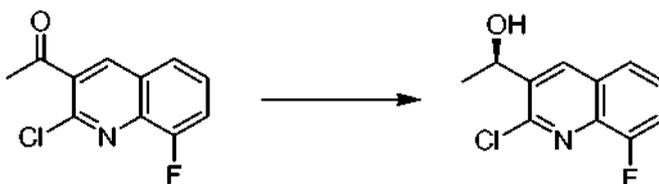
35

40

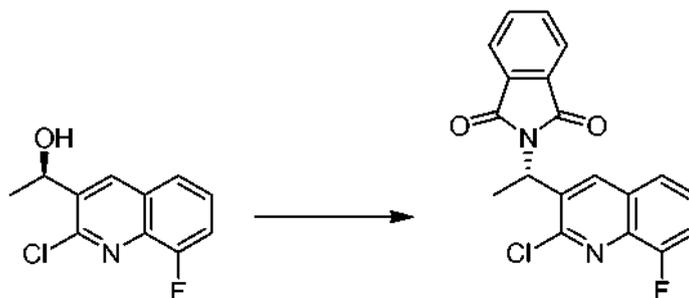
45

1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanona

5 A un matraz de fondo redondo que contenía tolueno (183 ml) se añadió 1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol (6,20 g, 27,5 mmol) y dióxido de manganeso (19,1 g, 220 mmol, 8 equiv.). La reacción se calentó a reflujo durante 2 h, se enfrió a ta, se filtró y se concentró. El producto se diluyó con hexanos y se filtró para dar 1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanona (4,43 g, rendimiento de un 72 %) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,40 (d, *J* = 1,6 Hz, 1 H), 7,71 (d a, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,56 (td, *J* = 7,8, 5,1 Hz, 1 H), 7,54 (ddd, *J* = 9,8, 7,8, 1,6 Hz, 1 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 223,9 (*M* + 1).

(*R*)-1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol

15 En un matraz de fondo redondo se disolvió (+)-dip-cloruro(tm) (17,5 g, 540 mmol, 2,2 equiv.) en THF anhidro (200 ml) y la solución se enfrió a -55 °C (usando un baño de hielo seco/MeCN). A esta solución se añadió 1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanona (5,50 g, 24,5 mmol) como una solución en THF (50 ml). La reacción se dejó calentar a ta lentamente durante una noche. Después de este tiempo, la reacción se interrumpió con 10 ml de acetona y 100 ml de Na₂CO₃ al 10 % y se permitió la agitación durante 2 h a ta. Se añadió acetato de etilo (750 ml) y las fases se separaron. La fase orgánica se lavó 3x con una solución saturada de bicarbonato sódico al 50 % y una vez con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtra y se concentró. El material en bruto se concentró a alto vacío a 75 °C para retirar el pineno. El residuo se suspendió en 150 ml de hexanos y 150 ml de agua durante 3 h a ta. Se formó un precipitado de color blanco y se filtró y se secó para proporcionar 4,9 g de producto ee al 98 %. El sólido se disolvió en 25 ml de EtOAc en ebullición y se añadieron 25 ml de hexanos en caliente se añadió para formar un precipitado a reflujo. La mezcla se enfrió a -15 °C, se filtró, y se lavó con hexanos:EtOAc a 9:1 en frío para proporcionar (*R*)-1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol (4,07 g, rendimiento de un 73 %). La HPLC quiral (IPA al 10 % en hexanos, chiralcel AD-H muestra que el producto tiene un ee > 99,9 %. El enantiómero deseado se eluye a los 9,6 min, el enantiómero no deseado se eluye a los 8,1 min. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,43 (s a), 7,64 (d a, *J* = 8,2 Hz, 1 H), 7,50 (td, *J* = 7,8, 4,7 Hz, 1 H), 7,41 (ddd, *J* = 10,2, 7,8, 1,2 Hz, 1 H), 5,40 (cd, *J* = 5,9, 0,8 Hz, 1 H), 2,22 (s a, 1 H), 1,62 (d, *J* = 6,3 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 226,0 (*M* + 1).

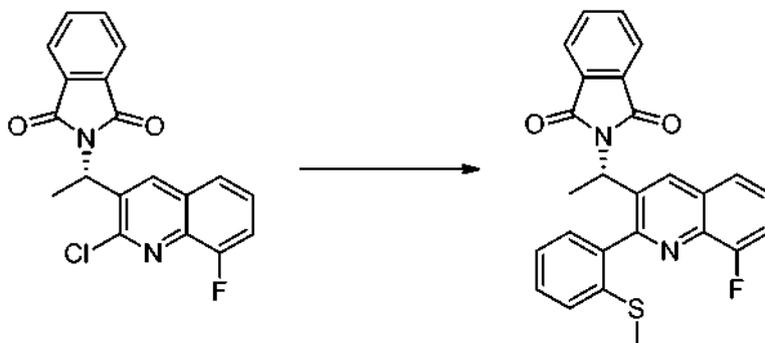
(*S*)-2-(1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona

35 En un matraz de fondo redondo se combinó ftalimida (6,38 g, 43,3 mmol), trifetilfosfina (1,14 g, 43,3 mmol) y (*R*)-1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etanol (8,15 g, 36,2 mmol) en THF (240 ml). La solución se enfrió a 0 °C y se añadió diisopropilazodicarboxilato (DIAD, 8,5 ml, 43,3 mmol) gota a gota. La reacción se dejó calentar a ta durante una noche. La reacción se concentró hasta un volumen de ~100 ml y se diluyó con 1 l de Et₂O y 200 ml de agua. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo de nuevo con 200 ml de Et₂O, Las fases orgánicas combinadas se lavaron con 160 ml de salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. La cromatografía en

40

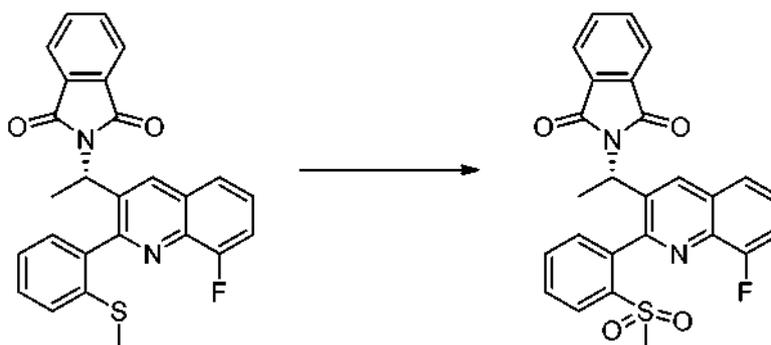
columna usando DCM al 100 % proporcionó (S)-2-(1-(2-cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (10,5 g, rendimiento de un 82 %). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,60 (s a, 1 H), 7,74 (m, 2 H), 7,64 (m, 3 H), 7,45 (td, J = 7,8, 4,9 Hz, 1 H), 7,35 (ddd, J = 10,2, 7,8, 1,2 Hz, 1 H), 5,89 (c, J = 7,2 Hz, 1 H), 1,90 (d, J = 7,0 Hz, 3 H).

5 **2-((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona**



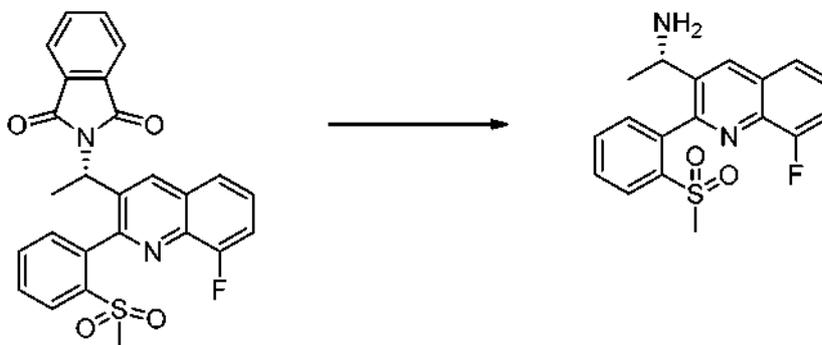
10 (S)-2-(1-(2-Cloro-8-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (14,0 g, 39,5 mmol), ácido 2-(metiltio)fenilborónico (9,95 g, 59,2 mmol) y carbonato potásico (16,4 g, 118 mmol) se combinaron en 300 ml de DMF anhidra en una atmósfera de N₂. La solución se roció con N₂ durante ~5 min antes de añadir PdCl₂(dppf)CH₂Cl₂ (3,22 g, 3,95 mmol). La solución se calentó a 100 °C durante 3 h, y a continuación se enfrió a 50 °C. La solución se concentró al vacío para dar un residuo de color pardusco, que se diluyó con EtOAc (600 ml). Las fases orgánicas se lavaron a continuación con H₂O (3 x 80 ml), seguido de salmuera (1 x 100 ml). Las fases acuosas combinadas se extrajeron con DCM (3 x 200 ml). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄ y a continuación se concentraron al vacío. El residuo obtenido se purificó por gel de sílice cromatografía ultrarrápida eluyendo con un gradiente de hexano al 20 % a EtOAc al 40 %/hexano. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron al vacío para dar 2-((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (14,6 g, 33,0 mmol, rendimiento de un 84 %) en forma de una espuma de color amarillo claro. La RMN del protón refleja una proporción de 53/47 de atropisómeros a 25 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,71 (s a, 0,53 H), 8,65 (s a, 0,47 H), 7,79 (m, 1H), 7,66 (s, 4 H), 7,55 (m, 1 H), 7,45-7,27 (serie de m, 3,6 H), 6,87 (m, 1,4 H), 5,70 (c, J = 6,4 Hz, 0,47 H), 5,63 (c, J = 6,8 Hz, 0,53 H), 2,47 (s a, 1,4 H), 1,91 (m, 3 H), 1,52 (s a, 1,6 H). Espectro de Masas (ESI) m/e = 443,2 (M + 1).

25 **2-((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)-3-quinolinil)etil)-1H-isoindolo-1,3(2H)-diona**



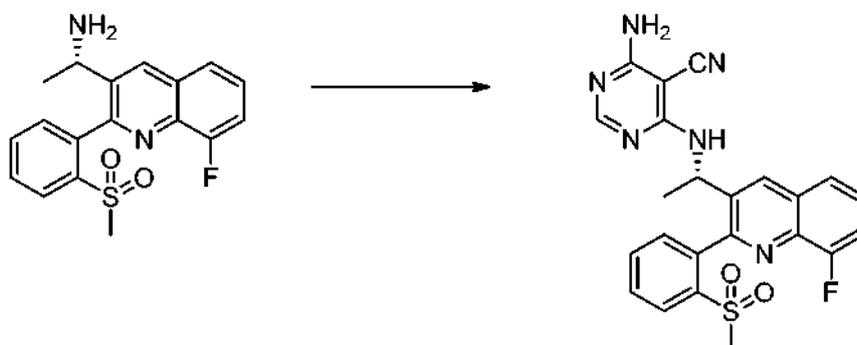
30 A 70 ml de DCM se añadieron 13,56 g (1,2 g/1 mmol de sustrato) de Montmorillonita húmeda (~0,2 g de H₂O/1 g de arcilla), y oxone (17,37 g, 28,2 mmol). A esta suspensión se añadió una solución de 2-((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (5,0 g, 11,3 mmol) disuelta en DCM (10 ml). La suspensión se agitó a ta durante 72 h y a continuación se filtró a través de un embudo con frita. Los sólidos se lavaron con DCM (~600 ml) y los filtrados se concentraron al vacío para dar 2-((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)-3-quinolinil)etil)-1H-isoindolo-1,3(2H)-diona 7,11 g (97 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. La RMN del protón refleja una proporción a 59/41 de atropisómeros a 25 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,86 (s, 0,59 H), 8,79 (s, 0,41 H), 8,26 (d, J = 7,8 Hz, 0,41 H), 8,04 (d, J = 7,8 Hz, 0,59 H), 7,89-7,36 (series of m, 9,6 H), 7,20 (d, J = 7,6 Hz, 0,41 H), 5,70 (c, J = 7,1 Hz, 0,59 H), 5,54 (c, J = 7,3 Hz, 0,41 H), 3,19 (s, 1,75 H), 3,15 (s, 1,25 H), 1,98 (d, J = 7,3 Hz, 1,75 H), 1,85 (d, J = 7,1 Hz, 1,25 H). Espectro de Masas (ESI) m/e = 475,0 (M + 1).

40 1. Hirano, M.; Tomaru, J.; Morimoto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, *64*, 3752-54.

(1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)-3-quinolinil)etanamina

5 2-((1S)-1-(8-Fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinolin-3-il)etil)isoindolín-1,3-diona (9,10 g, 19,2 mmol) e hidrato de hidrazina (9,32 ml, 192 mmol) se añadieron a EtOH (190 ml). Después de calentamiento a 65 °C durante 3 h, la suspensión resultante se enfrió a ta, se diluyó con 900 ml de EtOAc, y se filtró a través de un embudo con fritta. El filtrado se lavó con H₂O (3 x 200 ml) y salmuera (1 x 200 ml) y a continuación se secó sobre MgSO₄ antes de su concentración al vacío para dar (1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinolin-3-il)etanamina (6,06 g, 17,6 mmol, rendimiento de un 92 %) en forma de un sólido de color naranja claro. La RMN del protón refleja una proporción a 73/27 de atropisómeros a 25 °C. RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) δ ppm 8,55 (d, *J* = 1,5 Hz, 0,73 H), 8,50 (d, *J* = 1,5 Hz, 0,27 H), 8,26 (dd, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 0,27 H), 8,23 (dc, *J* = 7,8 1,2 Hz, 0,73 H), 7,73 (m, 3 H), 7,52 (m, 1,27 H), 7,40 (m, 1,73 H), 4,16 (c, *J* = 6,6 Hz, 0,27 H), 4,03 (c, *J* = 6,4 Hz, 0,73 H), 3,36 (s, 0,79 H), 3,17 (s, 2,21 H), 1,36 (m, 3H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 345,2 (*M* + 1).

15

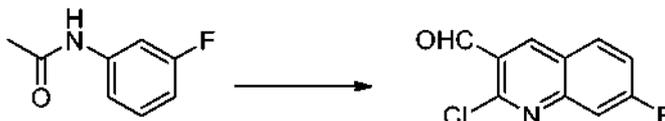
4-amino-6-(((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)-3-quinolinil)-etil)amino)-5-pirimidincarbonitrilo

20 (1S)-1-(8-Fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinolin-3-il)etanamina (9,16 g, 26,6 mmol), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (13,7 ml, 80 mmol) y 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (4,32 g, 27,9 mmol) se combinaron en n-butanol (67 ml) y a continuación se calentó a 110 °C en una atmósfera de N₂. Después de 3 h a 110 °C, la temperatura de la reacción aumentó a 120 °C durante 2 h. Después de enfriamiento en un baño de hielo, la mezcla se filtró dejando 14 g de un sólido de color pardusco. El filtrado se calentó a 120 °C durante 3 h, se enfrió a 40 °C y se concentró al vacío dejando un aceite de color marrón. El aceite y los sólidos se combinaron y se purificaron en una columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con MeOH al 2 %/DCM. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron al vacío para dar un sólido amarillento claro. Las fracciones que contenían el producto impuro se combinaron y se purificaron en una columna ultrarrápida sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de MeOH al 1,5 %/DCM a MeOH al 2 %/DCM. Las fracciones que contenían el producto puro se combinaron y se concentraron al vacío para dar un sólido de color amarillento claro. Los sonidos puros combinados se disolvieron en EtOH con calentamiento (~60 °C), y a continuación se concentraron al vacío, la disolución se repitió en EtOH seguido de concentración al vacío. Los sólidos obtenidos se secaron a continuación en la línea de vacío a 120 °C hasta que la concentración residual de etanol era inferior a un 0,5 % en peso. El sólido obtenido era 4-amino-6-(((1S)-1-(8-fluoro-2-(2-(metilsulfonyl)fenil)-3-quinolinil)etil)-amino)-5-pirimidincarbonitrilo, 10,3 g (rendimiento de un 84 %). La RMN del protón refleja una proporción a 87/13 de atropisómeros a 25 °C. RMN ¹H (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,80 (s a, 0,13 H), 8,58 (s a, 0,87 H), 8,13 (dd, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 0,87 H), 7,95-7,52 (serie de m, 8H), 7,30-6,99 (m a, 2 H), 6,82 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 5,62 (quintuplete, *J* = 6,9 Hz, 0,13 H), 5,22 (quintuplete, *J* = 6,9 Hz, 0,87 H), 3,37 (s, 2,57 H), 3,31 (s, 0,43 H), 1,60 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,4 H), 1,35 (d, *J* = 6,9 Hz, 2,6 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 463,1 (*M* + 1).

40

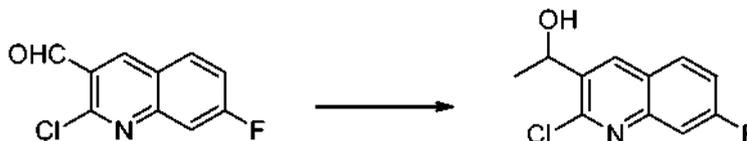
Ejemplo 2: Preparación de (S)-4-amino-6-((1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)-fenil)quinolin-3-il)etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo**2-cloro-7-fluoroquinolina-3-carbaldehído**

5



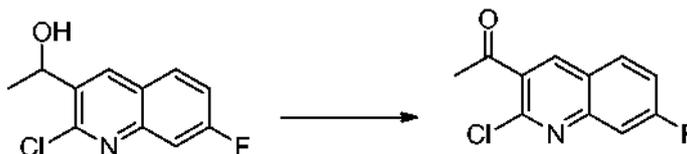
POCl₃ (0,837 l, 9,17 mmol) se añadió gota a gota a DMF (253 ml, 3,28 mmol) en un matraz de tres bocas equipado con agitador mecánico a 0 °C. La mezcla semisólida se agitó a ta durante 30 min y se añadió N-(3-fluorofenil)acetamida (200 g, 1,31 mol) en una porción. La mezcla resultante se calentó a 75 °C durante una noche. Después de enfriar a ta, la mezcla de reacción se vertió con cuidado en agua con hielo (9 kg). El sólido resultante se filtró, se lavó con agua, NaHCO₃, y se secó al aire. La mezcla en bruto (200 g, 73 %) se recristalizó en EtOAc (5 l) para dar 2-cloro-7-fluoroquinolin-3-carbaldehído en forma de agujas de color blanquecino (150 g). Espectro de Masas (ESI) m/e = 210 (M + 1).

15

1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanol

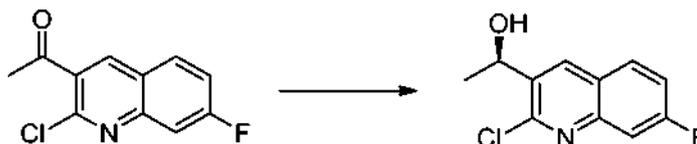
Una suspensión de 2-cloro-7-fluoroquinolin-3-carbaldehído (44,7 g, 213 mmol) en THF (600 ml) se trató con MeMgBr (78,0 ml, 234 mmol, 1,1 equiv.) a -20 °C. Después de agitar durante una noche, la reacción se interrumpió con una solución de NH₄Cl y se extrajo con Et₂O (300 ml y 100 ml). Las fases orgánicas se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se concentraron y se recristalizaron en EtOAc (100 ml) y hexano (1 l). se obtuvo un sólido de color amarillo pálido de 1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)-etanol (41 g, 85%). Espectro de Masas (ESI) m/e = 226 (M + 1).

25

1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanona

1-(2-Cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanol (7,7 g, 34 mmol), MnO₂ (30 g, 10 equiv.) y Tolueno (200 ml) se calentaron a reflujo durante 2 h. La LC-MS mostraba la finalización de la reacción. La filtración seguida por la retirada de disolvente dio un sólido de color blanquecino de 1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanona (6,2 g, 81 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 224 (M + 1).

35

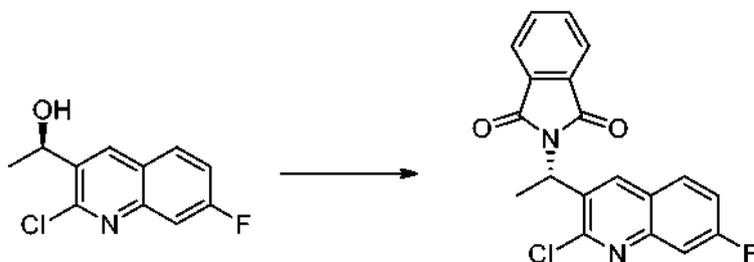
(R)-1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanol

Una solución de 1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanona (164 g, 733 mmol) en THF (1,34 l) se añadió a una solución de (+)-DIP-Cl (517,5 g, 2,2 equiv.) en THF (3,5 l) a -45 °C (hielo seco y acetonitrilo) gota a gota. La reacción se calentó lentamente hasta una ta durante una noche. La reacción se inactivó a continuación con acetona (750 ml) y Na₂CO₃ al 10 % (750 ml) a 0 °C y se agitó a ta durante 1 h antes de la adición de EtOAc (3,5 l). La mezcla se calentó hasta ta y se lavó con Na₂CO₃ al 10 % y agua. La fase orgánica se secó con salmuera, se concentró y se trató con hexano (1,0 l) y agua (1,8 l). La mezcla se agitó a ta durante 40 min y se filtró. El sólido de color blanco se lavó con agua y hexano, se secó al aire durante una noche (143 g). Este material se secó en el rotavapor a 60 °C durante 4 h

45

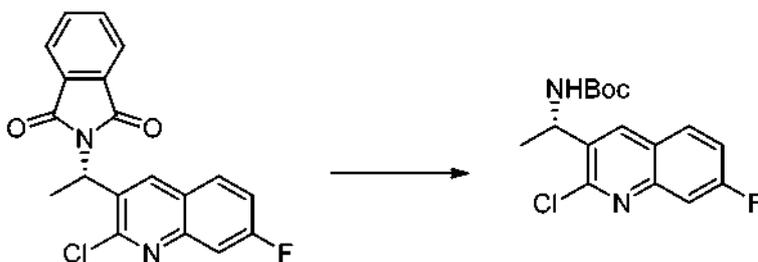
a alto vacío (267 Pa) para dar un polvo de color blanco de (R)-1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanol (122 g, 73,7 %). La HPLC quiral en columna de AD (isopropanol en hexano, 10 %) mostraba un ee > 99 %. Espectro de Masas (ESI) m/e = 226 (M + 1).

5 **(S)-2-(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona**



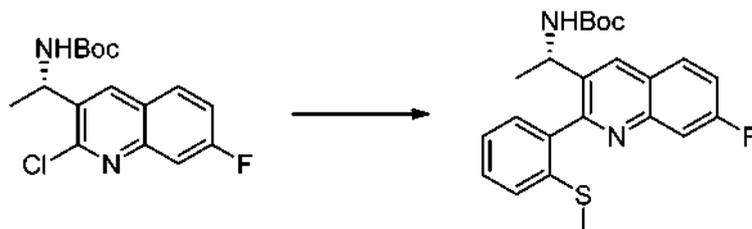
10 A una mezcla de (R)-1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etanol (3,03 g, 13,4 mmol), ftalimida (2,37 g, 1,20 equiv.) y PPh₃ (4,23 g, 1,20 equiv.) en THF (70 ml) se añadió DIAD (3,13 ml, 1,20 equiv.) gota a gota a 0 °C. A continuación, la mezcla se agitó a ta durante una noche antes de repartir entre EtOAc (200 ml) y agua (200 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (DCM) para dar una espuma de color blanco de (S)-2-(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (3,8 g, 80 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 355 (M + 1).

15 **(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)carbamato de (S)-terc-butilo**

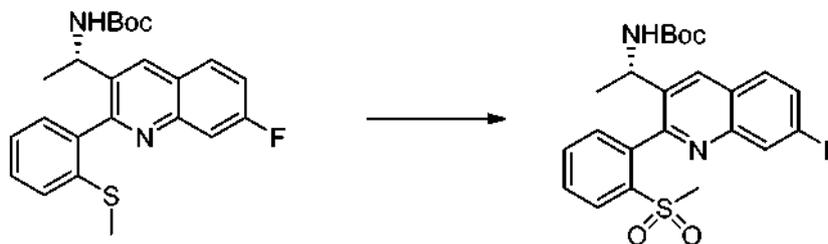


20 A una solución de (S)-2-(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (1,0 g, 2,8 mmol) en EtOH (10 ml) se añadió gota a gota NH₂NH₂ (10 equiv., 0,88 ml) a ta antes de calentar a 90 °C durante 30 min. Después de enfriar a ta, la mezcla de reacción se concentró, se repartió entre EtOAc (20 ml) y agua (5 ml). La fase orgánica se separó, se lavó con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para dar un aceite incoloro, que se disolvió en THF (10 ml) y se trató con BOC₂O (1,1 equiv., 0,68 g) y TEA (1,0 equiv., 0,39 ml) a reflujo. Después de enfriar a ta, la mezcla de reacción se concentró y se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (EtOAc/hexano, 1/9) para dar un sólido de color blanco, (1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)carbamato de (S)-terc-butilo (0,70 g, 76 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 325 (M + 1).

30 **(1-(7-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)quinolin-3-il)etil)-carbamato de(S)-terc-butilo**

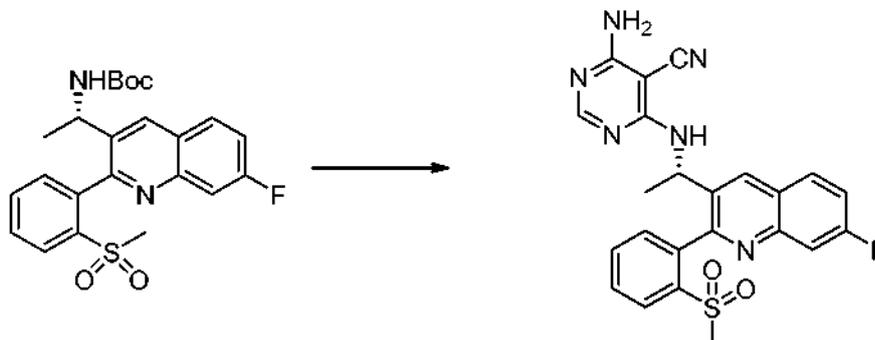


35 Una mezcla de (1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)carbamato de (S)-terc-butilo (382 mg, 1,2 mmol), ácido 2-(metiltio)fenilborónico (257 mg, 1,3 equiv.), Na₂CO₃ (623 mg, 5,0 equiv.), Pd(PPh₃)₄ (93 mg, 5 %), MeCN (9 ml) y agua (3 ml) se calentó a 85 °C en atmósfera de N₂ durante una noche. Después de enfriar a ta, la reacción se repartió entre EtOAc (10 ml) y agua (5 ml). La fase orgánica se separó, se lavó, seco y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice para dar un sólido de color blanco, (1-(7-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)quinolin-3-il)etil)carbamato de (S)-terc-butilo (460 mg, 94,8 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 413 (M + 1).

(1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)etil)-carbamato de (S)-terc-butilo

5 En una atmósfera de N₂, se disolvió (1-(7-fluoro-2-(2-(metiltio)fenil)-quinolin-3-il)etil)carbamato de (S)-terc-butilo (412 mg, 999 μmol) en acetona (3,00 ml, 40,8 mmol) y agua (3 ml), y se añadió NMO (351 mg, 3,00 mmol) seguido de OsO₄ (12,7 mg, 0,05 mmol). La reacción se dejó en agitación a ta durante una noche. La LC-MS mostraba que la reacción no era completa. La reacción se trató con OsO₄ (12,7 mg, 0,05 mmol) de nuevo y se agitó durante una noche. La LC-MS mostraba solamente una traza del reactivo de partida. La reacción se interrumpió mediante la adición de 5 ml de una solución saturada de tiosulfato sódico. La reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con Na₂CO₃ al 5 %, La fase orgánica se lavó a continuación con salmuera, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo en bruto se purificó eluyendo con EtOAc de un 30 % a un 60 % en hexanos para proporcionar un sólido de color blanco, (1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)-etil)carbamato de (S)-terc-butilo (440 mg, 99 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 445 (M + 1).

15

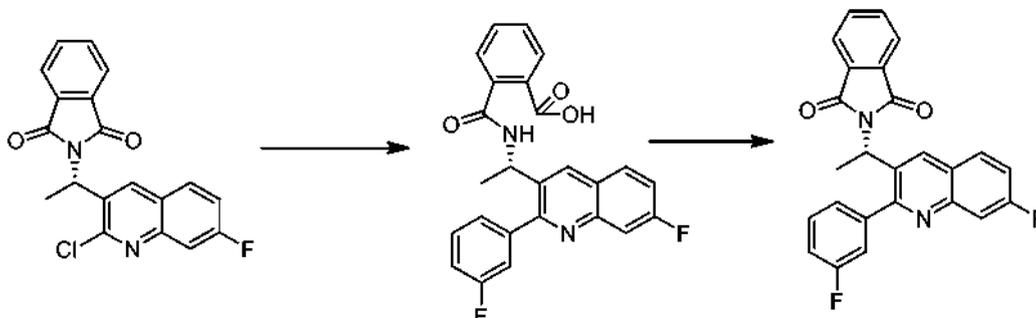
(S)-4-amino-6-((1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)etil)-amino)pirimidin-5-carbonitrilo

20 A (1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)etil)-carbamato de (S)-terc-butilo (440 mg, 1,0 mmol) se añadió HCl, 4 M (1 ml). La mezcla resultante se agitó a ta durante 1 h. El disolvente se retiró y la (S)-1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)etanamina en bruto se usó sin tratamiento adicional. Una solución de (1S)-1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)-quinolin-3-il)etanamina (100 mg, 290 μmol), 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (45 mg, 290 μmol) y DIEA (101 μl, 581 μmol) en DMF (4 ml) se calentó a 100 °C durante una noche. El disolvente se retiró a presión reducida y se purificó mediante TLC preparativa usando un 3 % de MeOH/DCM para proporcionar un polvo de color blanco de (S)-4-amino-6-((1-(7-fluoro-2-(2-(metilsulfonil)fenil)quinolin-3-il)etil)-amino)pirimidin-5-carbonitrilo (6,9 mg, 5,1 %). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 1,51 (d, J = 7,09 Hz, 3 H) 3,17 (s, 3 H) 5,43 (d, J = 6,85 Hz, 1 H) 7,48 (d, J = 2,45 Hz, 1 H) 7,60 - 7,63 (m, 1 H) 7,66 - 7,69 (m, 2 H) 7,73 (d, J = 1,47 Hz, 1 H) 7,81 (s, 1 H) 8,07 (dd, J = 9,05, 6,11 Hz, 1 H) 8,13 - 8,17 (m, 1 H) 8,49 (s, 1 H). Espectro de Masas (ESI) m/e = 463 (M + 1).

30

Ejemplo 3: Preparación de 4-amino-6-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)-quinolin-3-il)etilamino)pirimidin-5-carbonitrilo.**2-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona**

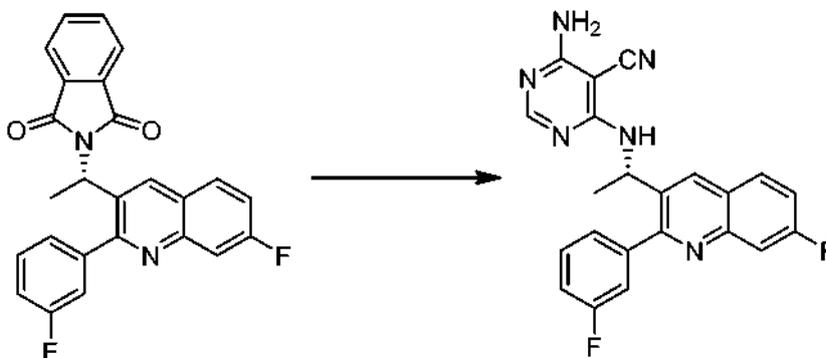
5



A una solución de (S)-2-(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (150 mg, 423 μmol), ácido 3-fluorofenilborónico (65 mg, 465 μmol) y carbonato sódico (90 mg, 846 μmol) en MeCN (8 ml) y agua (2 ml) se purgó con N_2 seguido de la adición de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (24 mg, 21 μmol) y la mezcla resultante se agitó a 90 °C durante una noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc lavado con agua y salmuera y se secó sobre Na_2SO_4 . La purificación usando TLC preparativa eluyendo con EtOAc al 100 % proporcionó ácido 2-(((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etil)carbamoyl)benzoico (120 mg, 66 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 433 (M + 1). El ácido 2-(((S)-1-(7-Fluoro-2-(3-fluorofenil)-quinolin-3-il)etil)carbamoyl)benzoico se disolvió en EtOH (2 ml) y se añadió HCl cond (0,1 ml). La solución resultante se calentó a 80 °C durante 4 h. El disolvente se retiró y se añadió NaHCO_3 satd a la mezcla de reacción y se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 , se concentró y se purificó a través de TLC preparativa usando al MeOH 3%/DCM saturado con gas NH_3 para proporcionar un sólido de color blanco de 2-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (85 mg, 49 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 415 (M + 1).

4-amino-6-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etilamino)-pirimidin-5-carbonitrilo

20

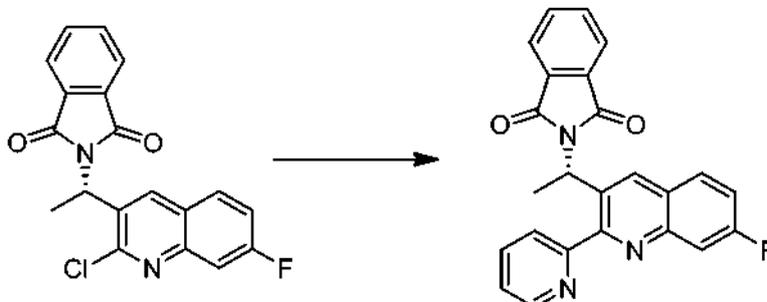


A una solución de 2-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etil)-isoindolin-1,3-diona (60,0 mg, 145 μmol) en EtOH (2 ml) se añadió NH_2NH_2 (1,0 ml, 1,45 mmol, 10 equiv.) y la solución resultante se calentó a 80 °C durante 2 h. Un precipitado se retiró por filtración y el filtrado se retiró a presión reducida para proporcionar (1S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)etanamina. Al residuo en bruto de (1S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)quinolin-3-il)-etanamina en DMF (2 ml) se añadió 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (22 mg, 145 μmol) y DIEA (0,06 ml, 319 μmol). La mezcla resultante se calentó a 100 °C durante una noche. El disolvente se retiró a presión reducida y se purificó a través de HPLC preparativa usando MeCN al 15-60 %/ H_2O en p/ TFA al 0,01 % para proporcionar un sólido de color blanco de 4-amino-6-((S)-1-(7-fluoro-2-(3-fluorofenil)-quinolin-3-il)etilamino)pirimidin-5-carbonitrilo (9,3 mg, 16 %). RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) δ ppm 1,63 (d, $J = 6,85$ Hz, 3 H) 5,70 (c, $J = 7,01$ Hz, 1 H) 7,25 -7,34 (m, 1 H) 7,44 -7,54 (m, 2 H) 7,55 -7,63 (m, 2 H) 7,74 (dd, $J = 9,78, 2,45$ Hz, 1 H) 8,05 (s, 1 H) 8,18 (dd, $J = 9,05, 5,87$ Hz, 1 H) 8,72 (s, 1 H). Espectro de Masas (ESI) m/e = 403 (M + 1).

35

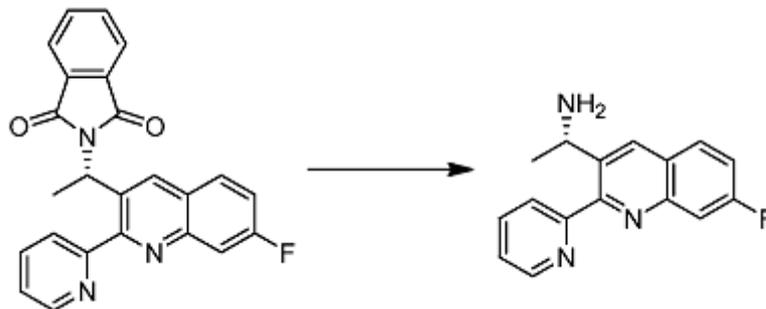
Ejemplo 4: Preparación de (S)-4-amino-6-((1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)-quinolin-3-il)etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo**2-((S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona**

5

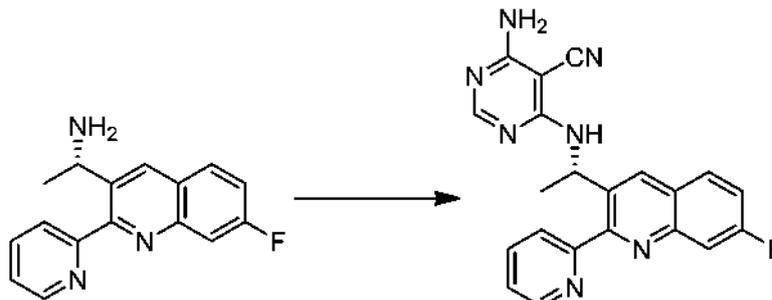


Una mezcla de (S)-2-(1-(2-cloro-7-fluoroquinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (85,6 g, 241 mmol), Pd(PPh₃)₄ (14 g, 12 mmol, 0,05 equiv.) y 2-(tributylestannil)-piridina (107 g, 289 mmol, 1,2 equiv.) en dioxano (3,0 l) se calentó a 90 °C en atmósfera de N₂. Después de agitar durante una noche, la LC-MS mostraba una finalización de un 30 %. La mezcla de reacción se calentó a 101 °C durante un periodo adicional de 2 días. La mezcla de reacción se enfrió a continuación a ta, se decantó y los 200 ml de solución restantes se filtraron para retirar el residuo de Pd. Los disolventes combinados se concentraron a 300 ml y se filtraron para dar un sólido de color castaño, que se lavó con EtOAc/hexano (1/1) y se secó para proporcionar (82,1 g). Las aguas madre se concentraron a 100 ml y se trataron con EtOAc/hexano, 1/1 (200 ml) para dar una segunda cosecha del producto (2,2 g). En general se obtuvo un sólido de color castaño de 2-((S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (84,3 g, 88 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 398 (M + 1).

20

(S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etanamina

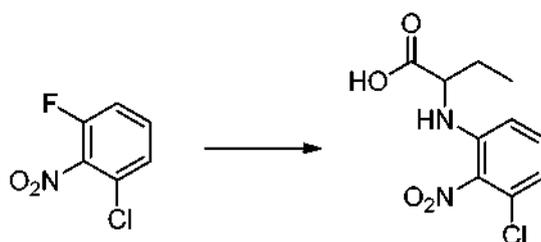
A una suspensión de 2-((S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etil)isoindolin-1,3-diona (2,1 g, 5,3 mmol) en etanol anhidro (15 ml) se añadió NH₂NH₂ (0,85 g, 26 mmol) gota a gota durante 5 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 30 min y se enfrió a ta. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con EtOAc. La solución resultante de EtOAc se lavó con agua y salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. La retirada de los disolventes proporcionó un aceite de color castaño de (S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etanamina (1 g, 71 %). Espectro de Masas (ESI) m/e = 468 (M + 1).

4-amino-6-((S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etilamino)pirimidin-5-carbonitrilo

Una mezcla de (S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3-il)etanamina (85 mg, 0,32 mmol), 4,6-dicloro-5-cianopirimidina (55 mg, 0,32 mmol, 1,0 equiv.) y N,N-diisopropiletanamina (68 μ l, 0,38 mmol, 1,2 equiv.) en THF (3 ml) se agitó a ta durante 30 min antes de calentar a 50 °C. Después de 4 h, la mezcla se concentró y se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/1/1) para dar un sólido de color blanco, que se trató con NH₃ saturado en dioxano (3 ml) en un tubo cerrado herméticamente a 110 °C durante una noche. La mezcla de reacción se concentró y se purificó por HPLC de fase inversa (MeCN/H₂O/TFA al 0,1 %) y se liofilizó para dar un polvo de color blanco de 4-amino-6-((S)-1-(7-fluoro-2-(piridin-2-il)quinolin-3 -il)etilamino)pirimidin-5-carbonitrilo (19 mg, 15 %). RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 1,78 (d, *J* = 6,85 Hz, 3 H) 5,82 (c, *J* = 6,85 Hz, 1 H) 7,71 (td, *J* = 8,80, 2,45 Hz, 1 H) 7,89 (dd, *J* = 9,66, 2,32 Hz, 1 H) 8,10 (ddd, *J* = 7,83, 5,62, 0,98 Hz, 1 H) 8,19 (s, 1 H) 8,27 (dd, *J* = 9,05, 5,87 Hz, 1 H) 8,45 (d, *J* = 7,83 Hz, 1 H) 8,63 (td, *J* = 7,95, 1,47 Hz, 1 H) 8,94 (s, 1 H) 9,03 -9,09 (m, 1 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 386 (M + 1).

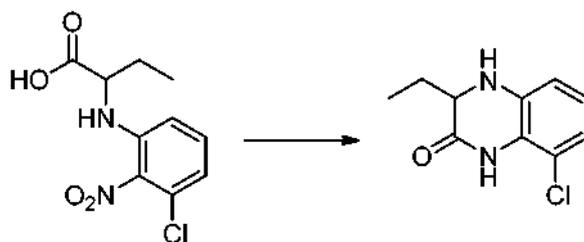
Ejemplo 5: Preparación de (S)-4-amino-6-((1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)-fenil)quinoxalin-2-il)etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo

15 Ácido 2-((3-cloro-2-nitrofenil)amino)butanoico



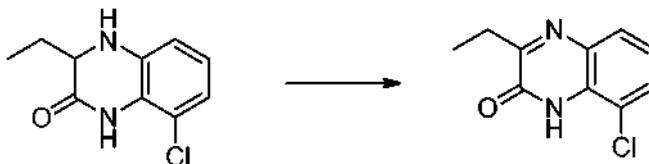
Una mezcla de 1-cloro-3-fluoro-2-nitrobenzene (2,00 Kg, 11,4 mol), ácido 2-aminobutírico (1,22 kg, 11,8 mol) y K₂CO₃ (1,58 Kg, 11,4 mol) en DMSO anhidro (4,2 l) se calentó a 80 °C durante 16 h (después de iniciar la reacción, la temperatura interna aumentó hasta 110 °C). En este momento, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. Después de enfriar a ta, la mezcla de reacción se vertió con cuidado en agua (10 l) con agitación vigorosa. La fase acuosa se lavó con metil terc-butil éter (2 x 5 l) para retirar las impurezas orgánicas. La fase acuosa se acidificó a continuación a pH ~1,5 con HCl cond para dar un sólido de color naranja. El sólido de color naranja se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 4 l) y se secó al aire para dar ácido 2-((3-cloro-2-nitrofenil)amino)butanoico (2,85 Kg), que se usó como tal en la siguiente etapa. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 7,35 (t, *J* = 8,3 Hz, 1 H), 6,82 - 6,91 (m, 2 H), 6,25 (d, *J* = 7,6 Hz, 1 H), 4,14 (td, *J* = 1A, 5,4 Hz, 1 H), 3,4 (s a, 1 H), 1,74 - 1,92 (m, 2 H), 0,88 (t, *J* = 1A Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 259,2 (M + 1).

30 8-cloro-3-etil-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona



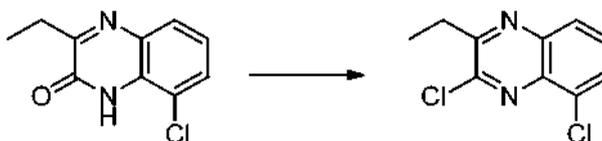
A una solución de ácido 2-((3-cloro-2-nitrofenil)amino)butanoico (1,5 Kg, 5,8 mol), HCl ac. 4 N (4,35 l, 17,4 mol) y EtOH (5,3 l) se añadió SnCl₂·2H₂O (3,93 Kg, 17,4 mol). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 5 h. En este momento, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. Después de enfriar a ta la mezcla de reacción se evaporó a presión reducida. El residuo resultante se enfrió a 0 °C usando un baño de hielo-agua y una solución acuosa de KOH 10 N (12 l, 180 mol) se añadió con cuidado con agitación vigorosa. Después de la filtración para retirar los sólidos insolubles, el filtrado se extrajo con DCM (2 x 10 l) lavado con agua y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó a presión reducida para dar 8-cloro-3-etil-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona (1,1 Kg) en forma de un sólido de color amarillo, que se usó sin purificación adicional. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 9,70 (s, 1 H), 6,65 - 6,83 (m, 3 H), 6,31 - 6,44 (m, 1 H), 3,66 -3,72 (m, 1 H), 1,53-1,71 (m, 2 H), 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 211,2 (M + 1).

45

8-cloro-3-etilquinoxalin-2(1H)-ona

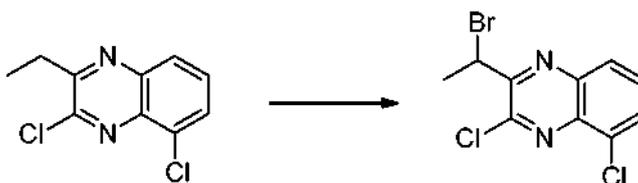
5 A una solución de 8-cloro-3-etil-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona (1,30 Kg, 6,17 mol) en 1,4-dioxano anhidro (15 l) se añadió DDQ (1,47 Kg, 6,48 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h (la temperatura interna aumentó hasta 45 °C después de adición de DDQ). Después de este tiempo, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. La mezcla se evaporó a presión reducida para dar un residuo de color marrón. A este residuo se añadió NaOH acuoso 2 M para ajustar el pH a 7 - 8. El sólido de color amarillo resultante se recogió por filtración, se suspendió en NaHCO₃ ac. saturado, se agitó durante 1 h, y se filtró para dar un sólido de color verde claro. El sólido de color verde claro se suspendió en NaHCO₃ acuoso saturado, se agitó, se filtró y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado y agua para dar un sólido de color blanquecino. El sólido de color blanquecino se suspendió en agua, se mezcló bien, se filtró, se lavó con agua, se secó al aire durante una noche, y se secó a alto vacío a 50 °C para dar 8-cloro-3-etilquinoxalin-2(1H)-ona (1 Kg). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 7,69 - 7,75 (m, 1 H), 7,59 - 7,65 (m, 1 H), 7,29 (t, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 2,84 (c, *J* = 1 A Hz, 2 H), 1,23 (t, *J* = 7,4 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 209,1 (M + 1).

15

3,5-dicloro-2-etilquinoxalina

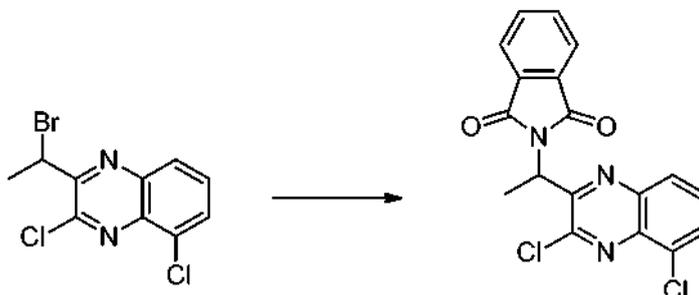
20 Una suspensión espesa de 8-cloro-3-etilquinoxalin-2(1H)-ona (1,00 Kg, 4,79 mol) en POCl₃ (2,68 l, 28,8 mol) se agitó a 100 °C durante 2 h. En este momento, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. Después de la retirada de la mayor parte del POCl₃ a presión reducida, el residuo se vertió con cuidado en agua con hielo y se neutralizó con una combinación de NaOH ac. 2 M y NaHCO₃ ac. saturado. La suspensión resultante se extrajo con DCM (3 x 4 l). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró, y se evaporó a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con hexano/EtOAc (30/1) para dar 3,5-dicloro-2-etilquinoxalina (840 g) en forma de un sólido de color blanco. RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 8,01-8,08 (m, 2 H), 7,84 (t, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 3,10 - 3,17 (d, *J* = 7,3 Hz, 2 H), 1,36 (t, *J* = 7,3 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 227,1 (M + 1).

25

2-(1-bromoetil)-3,5-dicloroquinoxalina

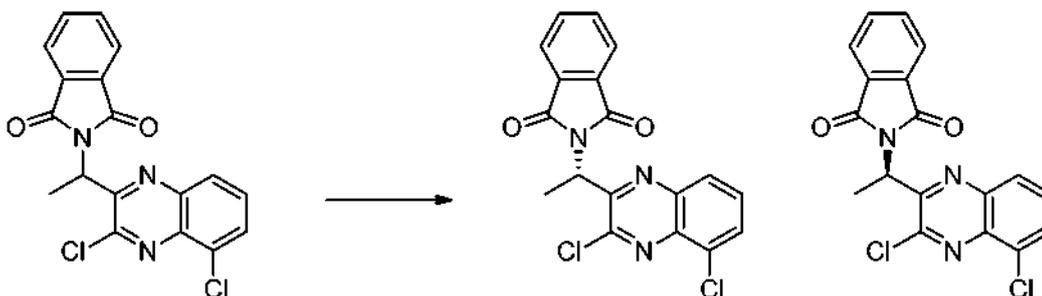
35 3,5-Dicloro-2-etilquinoxalina (1,10 Kg, 4,84 mol) se disolvió en CCl₄ (4,4 l) a ta. A continuación se añadieron 1, 3-dibromo-5, 5-dimetilhidantoína (762 g, 2,66 mol) y peróxido de benzoílo (116 g, 0,48 mol). La suspensión resultante se calentó a reflujo durante 2 h. En este momento, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. Después de enfriar a ta, se formaron cristales de color blanco en el recipiente de reacción. Los cristales de color blanco se recogieron por filtración, se lavaron con NaHCO₃ acuoso saturado (3 x 5 l), y se secaron a alto vacío para dar 2-(1-bromoetil)-3,5-dicloroquinoxalina en forma de un sólido de color blanco (1,05 Kg). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 8,04 - 8,12 (m, 2 H), 7,78 - 7,90 (m, 1 H), 5,76 - 5,84 (m, 1 H), 2,09 (d, *J* = 6,7 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 304,8 [(M + 1) (⁷⁹Br)], 306,9 [(M + 1) (⁸¹Br)].

40

2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona

5 A una solución de 2-(1-bromoetil)-3,5-dicloroquinoxalina (1,00 Kg, 3,27 mol) en DMF (8,2 l) se añadió ftalimida potásica (1,21 Kg, 6,54 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 3 h. En este momento, el análisis de LC-MS mostraba que la reacción era completa. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación de 50 l y se añadieron agua (12 l) y EtOAc (6 l) al mismo con agitación. Una gran cantidad de sólido de color blanco se trituró y se recogió por filtración. La fase acuosa se separó y se extrajo de nuevo con EtOAc (2 x 4 l). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y el volumen se redujo a 5 l a presión reducida. Después de enfriar a ta, el producto se obtuvo en forma de un sólido de color blanco. El sólido de color blanco se filtró, se trituró con hexano y se secó al vacío para dar 2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (1,24 Kg). RMN ¹H (DMSO-*d*₆) δ ppm 8,02 - 8,21 (2 H, m), 7,83 - 8,02 (m, 5 H), 5,89 (c, *J* = 6,8 Hz, 1 H), 1,87 (d, *J* = 6,8 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 372,0 (*M* + 1).

15

(S)-2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona

20 La 2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona racémica (1 Kg) se purificó en una unidad Novasep para HPLC. Las condiciones de funcionamiento usadas para el proceso de separación fueron:

Columna: CHIRALPAK®AS 20 μM, 11 cm id x 25 cm L

Fase Móvil: Hexano-IPA 70-30

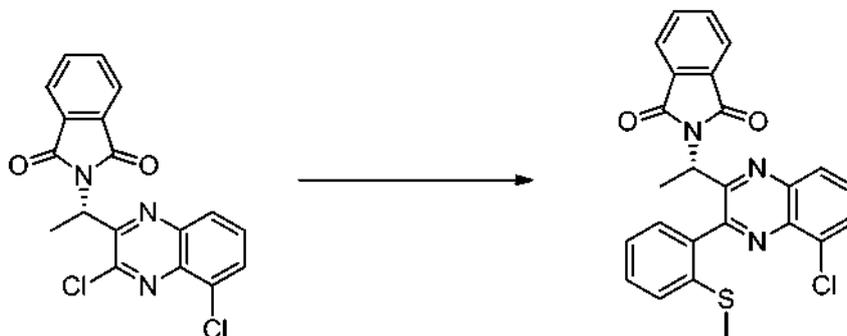
25 Caudal: 400 ml/min

Temperatura: 25 °C

Detección de UV: 340 nm

30 La solubilidad era de 1 g/l en la fase móvil. Para mantener la muestra solución fueron necesarios agitación y calentamiento. La solución se filtró antes de su uso. El volumen de inyección era de 510 ml cada 8,0 minutos. Las fracciones recogidas del proceso de cromatografía se evaporaron usando evaporadores de película fina Artisan y rotavapores a 45 °C. Después de retirada de disolvente, el producto se secó hasta peso constante en horno de vacío a 40 °C para dar: (S)-2-(1-(3,5-dicloro-quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona, 1^{er} enantiómero (425,7 g, rendimiento de un 85,1 %, e.e. de un 98,7 %) y (R)-2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolina-1,3-diona, 2^o enantiómero (432,5 g, rendimiento de un 86,2 %, e.e. de un 97,7 %).

35

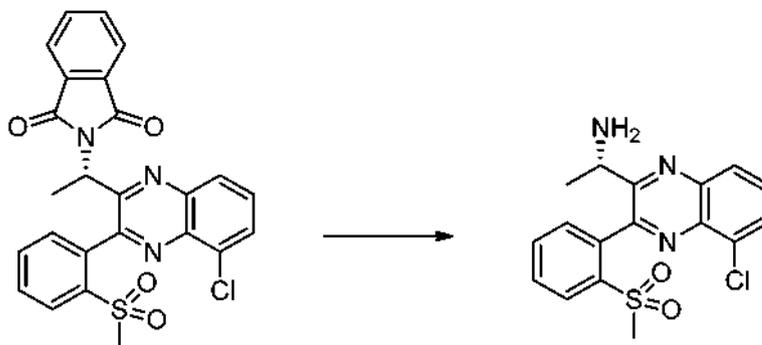
2-((1S)-1-(5-cloro-3-(2-(metiltio)fenil)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona

5 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un agitador mecánico, un condensador, una entrada de gas nitrógeno y una sonda de temperatura se cargó con DMF (2,16 l), (S)-2-(1-(3,5-dicloroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (273 g, 733 mmol) y ácido 2-(metiltio)fenilborónico (136 g, 807 mmol). A la mezcla, se añadió carbonato potásico (203 g, 147 mmol) y cloruro de [1,1-bis(di-fenilfosfino)ferroceno]paladio (ii), formando complejo con DCM (29,9 g, 36,7 mmol). La mezcla se purgó al vacío con N₂ (2 x), y se calentó a 100 °C. La reacción se controló por LC-MS, y se consideró completa después de 4 h. La reacción se enfrió a ta (21 °C), y a continuación se dividió en dos lotes. Cada lote se repartió entre EtOAc (1,08 l) y agua (1,35 l) en un embudo de decantación de número 4 l. Después de separación de fases, la fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 500 ml) y se concentró para proporcionar el producto en bruto. Los lotes combinados de material en bruto se cargaron sobre gel de sílice y se purificaron por cromatografía ultrarrápida (ISCO/RediSep™) (hexano:EtOAc = 10:0 a 6:4) para proporcionar el producto en forma de un sólido de color marrón claro de 320 g con una pureza de un 98 % por LC y rendimiento de un 95 %.

10 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,15 - 8,31 (m, 1 H), 8,07 (m, 1H), 7,93 (m, 1 H), 7,77 (m, 2 H), 7,64 (s. a., 2 H), 7,16 - 7,55 (m, 3 H), 6,58 - 7,02 (m, 1 H), 5,72 - 5,98 (m, 1H), 3,29 (s, 3 H), 1,79 (d, *J* = 6,9 Hz, 3 H) Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 460,0 (M + 1).

2-((1S)-1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etil)-isoindolin-1,3-diona

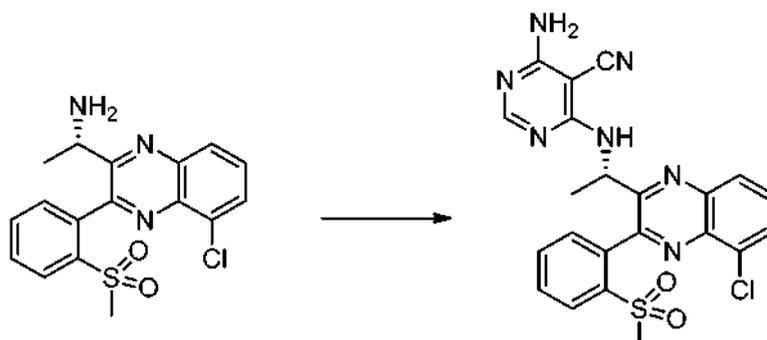
25 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un embudo de adición, entrada de nitrógeno, agitador superior y termopar se cargó con Montmorillonita K10 (274 g, 274 mmol) y agua (54,2 ml). La mezcla se agitó vigorosamente durante ~10 min, cuando se obtuvo un polvo de flujo libre. En este momento, se añadió DCM (1,26 ml) seguido de Oxone (421 g, 685 mmol). La temperatura de la reacción disminuyó hasta 15 °C. Una solución de 2-((1S)-1-(5-cloro-3-(2-(metiltio)fenil)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (126 g, 274 mmol) en DCM (630 ml) se añadió a ta (18-20 °C) a la suspensión de montmorillonita/oxone a través de un embudo de adición y la temperatura interna se controló para que fue inferior a 21 °C con un baño de agua/hielo. La reacción se agitó a ta (19-21 °C) y se controló por LC. Se consideró finalizada después de 96 h. La mezcla de reacción se filtró y los sólidos se lavaron con DCM (2 x 250 ml). La solución orgánica combinada se lavó con una solución acuosa de Na₂SO₃ al 10 % en peso (2 x 250 ml), se concentró y se secó para proporcionar el producto en forma de un sólido de color amarillo claro de 110 g con una pureza de un 97,6 % por LC y un rendimiento de un 82 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,14 - 8,29 (m, 1 H), 7,64 - 8,14 (m, 8 H), 7,52 (dd, *J* = 5,5, 3,0 Hz, 1 H), 7,21 -7,38 (m, 1 H), 5,59 - 5,94 (m, 1 H), 3,10 - 3,27 (m, 3 H), 1,66 - 1,91 (m, 3 H) Espectro de Masas (ESI) *m/z* = 492,0 (M + 1).

(S)-1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etanamina

5 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un agitador superior, termopar y condensador de reflujo con una entrada de nitrógeno se cargó con (S)-2-(1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (193 g, 392 mmol), agua (1351 ml) e hidrazina, solución al 35 % en peso en agua (711 ml, 785 mmol). La suspensión de color blanco resultante se agitó vigorosamente a 65 °C en atmósfera de nitrógeno durante 6 h y a continuación se dejó enfriar a ta durante una noche. Después de este tiempo, el análisis de LC-MS mostraba la conversión completa en el producto deseado. El sólido de color blanco se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó en el filtro de vidrio en una corriente de nitrógeno durante 4 h para dar (S)-1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etanamina (129,7 g). Espectro de Masas (ESI) $m/z = 362,0 (M + 1)$.

(S)-4-amino-6-((1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)-etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo

15



20 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 3 l equipado con un agitador superior, entrada de nitrógeno y termopar se cargó con (1S)-1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etanamina (130 g, 358 mmol), 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (55,4 g, 358 mmol), butan-1-ol (920 ml) y N,N-diisopropiletilamina (187 ml, 1,08 mol). La mezcla de reacción se calentó a una temperatura interna de 95-100 °C durante 6 h y a continuación se dejó enfriar a ta durante una noche. Después de este tiempo, la reacción se calentó a una temperatura interna de 100 °C y a continuación se enfrió hasta an temperatura interna de 50 °C. Se añadió acetato de etilo (~1,5 l) a 50 °C y la reacción se dejó enfriar a ta. La solución resultante se lavó con agua (3 x 1 l), NaHSO₄ ac. al 10 % en peso (4 x 1 l) y salmuera (1 x 500 ml). La fase orgánica separada se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío. El residuo resultante se suspendió en tolueno (1 l), se evaporó al vacío y se secó a alto vacío durante 36 h (se obtuvieron 247 g de material en bruto). El material en bruto se suspendió en EtOAc (2 l), se filtró y se lavó con una solución acuosa de NaHSO₄ al 10 % en peso (4 x 1 l). En la fase de EtOAc empezó a formarse un sólido de color blanco. Se añadió una barra de agitación magnética y la suspensión se agitó a ta durante una noche y a 0 °C durante 2 h. El sólido de color blanco se aisló por filtración del EtOAc y se secó en un filtro de vidrio en una corriente de nitrógeno durante dos días, el filtrado de EtOAc (filtrado A) se dejó aparte. El sólido de color blanco (51 g) suspendió a continuación en EtOAc (2 l) y se añadió NaHCO₃ acuoso saturado (1 l). La suspensión resultante se agitó durante 15 min dando como resultado una mezcla de dos fases. La fase orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró al vacío para dar el producto deseado. A continuación el filtrado A se concentró al vacío, se adsorbió sobre sílice y se purificó por MPLC (DCM/MeOH + NH₄OH al 10 %: 100/0 a 90/10) para dar 92 g del producto deseado. Los dos productos aislados se combinaron y se disolvieron en EtOH (500 ml). La solución resultante se concentró al vacío. Este proceso de disolución en EtOH y concentración se repitió tres veces (3 x 500 ml). El sólido resultante se molió (mortero y mano) hasta un polvo y se secó en un horno de vacío (temperatura: 90-100 °C) sobre P₂O₅ durante 84 h. Después de este tiempo con el material se molió de nuevo, se transfirió a un recipiente de gran tamaño y se secó a alto vacío a 100-110 °C durante 24 h para dar (S)-4-amino-6-((1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-2-il)etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo (127,9 g). RMN ¹H (DMSO-d₆) δ ppm 8,06 - 8,20 (m, 3 H), 7,96 - 7,77 (m, 5 H), 7,64-7,65 y 6,79-6,80 (m, 1 H), 7,28 (s. a., 2H), 5,42-5,45 (m, 1 H), 3,32 y 3,22 (s, 3 H), 1,51 y 1,40 (d, J = 6,6 Hz,

40

3 H). Espectro de Masas (ESI) $m/z = 480,0$ ($M + 1$). El análisis de Karl Fisher y GC de una muestra analítica mostró que el material contenía un 0,45 % en peso de agua y un 0,55 % en peso de EtOH.

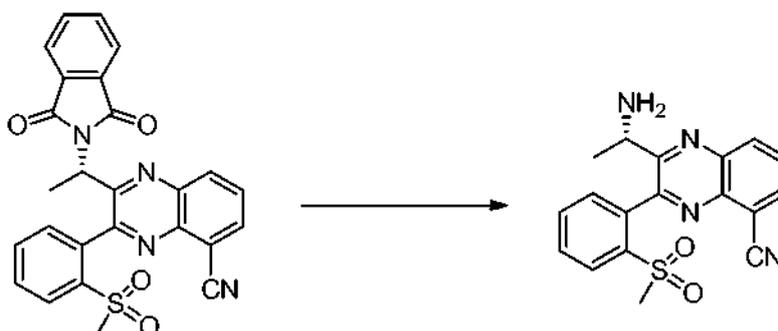
5 **Ejemplo 6: Preparación de 2-((S)-1-(6-amino-5-cianopirimidin-4-ilamino)-etil)-3-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinoxalin-5-carbonitrilo**

2-((S)-1-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etil)-3-(2-(metilsulfonyl)fenil)-quinoxalin-5-carbonitrilo

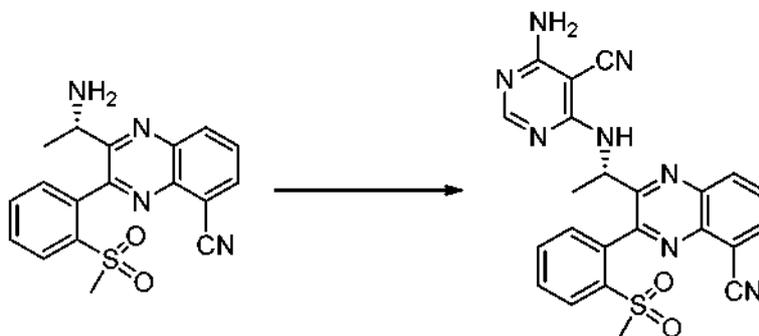


10 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un condensador, entrada de nitrógeno, agitador superior y termopar se cargó con 2-((1S)-1-(5-cloro-3-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (400 g, 813 mmol), dicianocinc (143 g, 1,22 mol) y 1,4-dioxano (4,0 l). La solución se agitó vigorosamente y se desgasificó con Ar durante 1 h. A continuación, a la solución se le añadió precatalizador de XPhos (66,1 g, 89 mmol).
 15 A continuación, la mezcla se desgasificó con Ar durante 1 h y se calentó a 90 °C. La reacción se controló por LC, y se consideró completa después de 8 h. La reacción se enfrió a ta (20-21 °C) y se dividió en dos lotes. Para cada lote, se añadieron EtOAc (2,0 l), NaHCO₃ (400 ml) y agua (400 ml). La mezcla se agitó durante 10 min y se formó un precipitado. Los precipitados se filtraron para proporcionar el producto puro en forma de un sólido de color blanco de 201,5 g. Las aguas madre se lavó con salmuera (800 ml) y la fase orgánica se concentró para proporcionar el producto en bruto de ~400 g. El material en bruto se suspendió a continuación en EtOAc (1,2 l) durante 30 min a ta. El sólido se filtró, se lavó con EtOAc (2 x 400 ml) y se secó para proporcionar el producto en forma de un sólido de color castaño de 220 g. Todos los sólidos se combinaron, se secaron en una frita sinterizada ha vacío suave y una corriente de N₂ durante 2 días para proporcionar el producto en forma de un sólido de color blanco de 378 g con una pureza de un 99,6 % por LC y un rendimiento de un 96 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,47 - 8,68 (m, 2 H), 7,66 - 8,19 (m, 7 H), 7,52 (dd, *J* = 5,5, 3,0 Hz, 1 H), 7,22 - 7,40 (m, 1 H), 5,61 - 5,95 (m, 1H), 3,11 - 3,27 (m, 3 H), 1,68 - 1,93 (m, 3H) Espectro de Masas (ESI) $m/z = 483,0$ ($M + 1$).

2-((S)-1-aminoetil)-3-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinoxalin-5-carbonitrilo



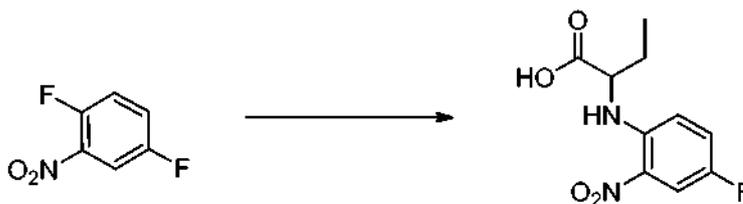
30 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con a entrada de nitrógeno, agitador superior y termopar se cargó con hidrato de hidrazina (381 ml, 783 mmol) y EtOH (3,0 l). A continuación a la solución se le añadió 2-((S)-1-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)etil)-3-(2-(metilsulfonyl)fenil)quinoxalin-5-carbonitrilo (378 g, 783 mmol) en una porción y se calentó a 80 °C. La reacción se controló por LC, y se consideró completa una vez que la reacción alcanzó de nuevo 80 °C. La reacción se enfrió a temp ambiente (20-21 °C), cuando se añadieron DCM (3,0 l) y NaHCO₃ satd. (600 ml). Después de separación de fases, la fase orgánica se lavó con salmuera (2 x 600 ml), se concentró y se secó al vacío y flujo de N₂ durante 24 h para proporcionar el producto en forma de un sólido de color amarillo claro de 257,7 g con una pureza de un 94,4 % por LC, (no se detectó enantiómero R) y un rendimiento de un 93 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,45 - 8,54 (m, 2 H), 8,18 (dt, *J* = 7,7, 1,5 Hz, 1 H), 8,05 (dd, *J* = 8,5, 7,4 Hz, 1 H), 7,76 - 8,00 (m, 3 H), 3,83 - 4,03 (m, 1 H), 3,25 - 3,32 (m, 3 H), 1,19 - 1,39 (m, 3 H). Espectro de Masas (ESI) $m/z = 353,0$ ($M + 1$).

2-((S)-número-(6-amino-5-cianopirimidin-4-ilamino)etil)-3-(2-(metilsulfonil)-fenil)quinoxalin-5-carbonitrilo

5 Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un agitador mecánico, un condensador, una entrada de gas nitrógeno y una sonda de temperatura se cargó con 2-((S)-1-aminoetil)-3-(2-(metilsulfonil)fenil)quinoxalin-5-carbonitrilo (257,7 g, 731 mmol), 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (120 g, 775 mmol) y butan-1-ol (2,5 l). La solución se agitó a ta (19-22 °C) durante 5 min y se añadió N,N-diisopropiletilamina (363 ml, 219 mmol) en una porción. La solución se calentó a 95 °C, se controló por LC, y se consideró completa después de 4 h. La reacción se enfrió a ta cuando se añadieron EtOAc (2,0 l) y agua (500 ml). Las dos fases se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera (500 ml), se concentró hasta retirar la mayor parte del EtOAc, y se forma un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó con una cantidad mínima de MeOH. El sólido se secó al vacío durante 18 h para proporcionar un sólido de color amarillo claro, 305 g. Las aguas madre se concentraron, hasta que precipitó más producto. El sólido se filtró, se lavó con MeOH (2 x 200 ml), se secó al vacío durante 24 h para proporcionar el producto en forma de un sólido (45 g). Un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l equipado con un agitador mecánico, una entrada de gas nitrógeno y una sonda de temperatura se cargó con el producto bruto combinado de 350 g y MeOH (3,5 l). La mezcla se agito a ta (19-22 °C) durante 2 días. El sólido se filtró, se lavó con MeOH (2 x 350 ml), se secó al vacío y flujo de N₂ durante 24 h para proporcionar un sólido de color crema (276,2 g) con una pureza de un 99,4 % por HPLC, (no se detectó enantiómero R) y un rendimiento de un 80 %. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,43 - 8,59 (m, 2 H), 8,01 - 8,23 (m, 2 H), 7,71- 7,99 (m, 4 H), 7,61 (d, *J* = 7,0 Hz, 1 H), 7,24 (s a, 2 H), 5,33 - 5,68 (m, 1 H), 3,19 - 3,33 (m, 3 H), 1,34 - 1,55 (m, 3 H) Espectro de Masas (ESI) m/z = 471,1 (M + 1).

Ejemplo 7: Preparación de (S)-4-amino-6-((1-(6-fluoro-3-(piridina-2-il)-quinoxalin-2-il)etil)amino)pirimidin-5-carbonitrilo

25 **Ácido 2-((4-fluoro-2-nitrofenil)amino)butanoico**

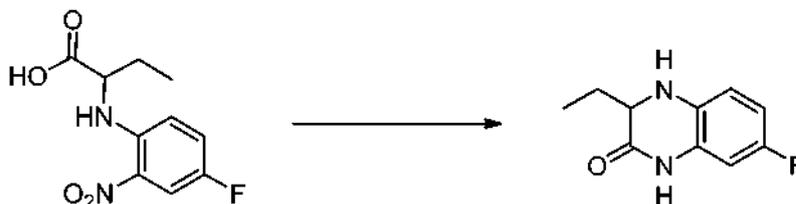


30 Una mezcla de 2,5-difluoronitrobenzoceno (119 ml, 1,10 mol), ácido 2-aminobutanoico (114 g, 1,10 mol) y carbonato potásico (152,2 g, 1,10 mol) en dimetilsulfóxido (410 ml, 1,10 mol) se agitó a 80 °C durante 23 h. ([Nota 1]: La mezcla tenía un color rojo anaranjado intenso. La temperatura interna de la mezcla se elevó hasta -110 °C durante 1 h y a continuación se redujo hasta 80 °C). Después de 23 h, la reacción se enfrió a ta y se vertió con cuidado en agua (2 l + 1 l). La mezcla acuosa se lavó con éter dietílico (1 l x 2) para retirar las impurezas orgánicas. La fase acuosa se acidificó a continuación a ~ pH 1,5 con HCl concentrado (300 ml) para generar un sólido de color amarillo. El sólido de color amarillo se recogió por filtración, se lavó con agua (3 l), y se secó al aire para dar el producto deseado, un sólido de color naranja húmedo. El sólido de color naranja húmedo se recristalizó en 3 l de tolueno y se dejó en reposo a ta durante una noche para proporcionar el producto deseado en forma de un sólido cristalino de color naranja. El sólido cristalino de color naranja se filtró, se lavó con tolueno (2 l), y se secó a alto vacío a 80 °C durante 4 h y a continuación en liofilizador durante una noche para proporcionar ácido 2-(4-fluoro-2-nitrofenilamino)-butanoico (203,6 g, rendimiento de un 76,4 %) en forma de un sólido cristalino de color naranja. El sólido cristalino de color naranja se llevó a la siguiente etapa sin purificación adicional.

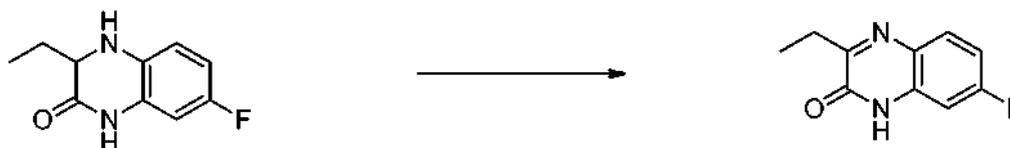
35 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 13,30 (s. a. 1 H), 8,28 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H), 7,90 (dd, *J* = 9,4, 2,9 Hz, 1 H), 7,49 - 7,60 (m, 1 H), 7,09 (dd, *J* = 9,6, 4,7 Hz, 1 H), 4,49 (dt, *J* = 7,2, 5,5 Hz, 1 H), 1,79 - 2,00 (m, 2 H), 0,85 - 0,93 (m, 3 H),

40 Espectro de Masas (ESI) m/e = 243,1 (M + 1).

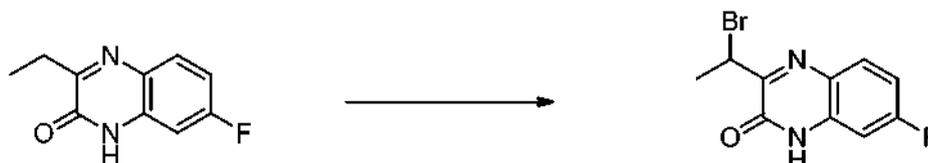
45

3-Etil-7-fluoro-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona

5 La mezcla heterogénea de ácido 2-(4-fluoro-2-nitrofenilamino)butanoico (181,7 g, 750,0 mmol), HCl ac. 3 N (750,0 ml, 2250 mmol) y etanol (1923 ml, 750,0 mmol) en un matraz de fondo redondo de tres bocas de 5 l se añadió a dihidrato de cloruro de estaño(II) (507,7 g, 2250 mmol) y la mezcla de color naranja se calentó a 78 °C con agitación usando un agitador superior durante 4 h ([Nota 1]: La mezcla heterogénea de color naranja se convirtió en una mezcla homogénea de color naranja y el color naranja cambió a un color rojo durante ~ 2 horas). Después de 10 4 h, la mezcla se enfrió a ta y se concentró a presión reducida para retirar etanol, y se dejó a ta durante 48 h. El precipitado de color amarillo resultante se recogió por filtración y se lavó con agua (500 ml). El sólido de color amarillo se suspendió en agua enfriada con hielo (1 l) y la mezcla se ajustó ~ pH 13 con KOH (~250 g). La mezcla heterogénea se extrajo con DCM (1 l x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua (1 l x 1) y salmuera (1 l x 1), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar 3-etil-7-fluoro-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona (60,92 g, rendimiento de un 41,8 %) en forma de un sólido de color amarillo claro. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,26 (s, 1 H), 6,68 (dd, *J* = 8,6, 5,5 Hz, 1 H), 6,47 - 6,61 (m, 2 H), 5,95 (d, *J* = 1,2 Hz, 1 H), 3,62 (ddd, *J* = 6,7, 5,0, 2,0 Hz, 1 H), 1,50 - 1,72 (m, 2 H), 0,92 (t, *J* = 7,4 Hz, 3 H), Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 195,1 (*M* + 1).

3-Etil-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona

25 A una solución homogénea de 3-etil-7-fluoro-3,4-dihidroquinoxalin-2(1H)-ona (60,61 g, 312,1 mmol) y 1,4-dioxano (1350 ml) se añadió 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (75,91 g, 327,7 mmol) y la mezcla se agitó usando un agitador superior a ta durante 2,5 h. En este momento, la mezcla se concentró a presión reducida para dar un residuo de color marrón. El residuo de color marrón se suspendió en NaHCO₃ acuoso saturado (2 l), se agitó durante 30 min, se filtró, se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (1 l) para dar un sólido de color verde claro. El sólido de color verde claro se volvió a suspender en NaHCO₃ acuoso saturado (500 ml), se mezcló bien, se filtró, y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado (500 ml) para dar un sólido de color blanquecino. El sólido de color blanquecino se suspendió en agua (500 ml), se mezcló bien, se filtró, se lavó con agua (1 l), se secó al aire durante una noche, y se secó a alto vacío a 22 °C durante 2 h para dar 3-etil-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona (56,87 g, rendimiento de un 94,8 %) en forma de un sólido de color blanquecino. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,36 (s. a., 1 H), 7,76 (dd, *J* = 9,0, 5,9 Hz, 1 H), 7,11 (td, *J* = 8,8, 2,7 Hz, 1 H), 7,00 (dd, *J* = 9,6, 2,7 Hz, 1 H), 2,78 (c, *J* = 7,4 Hz, 2 H), 1,20 (t, *J* = 7,4 Hz, 3 H) Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 193,0 (*M* + 1).

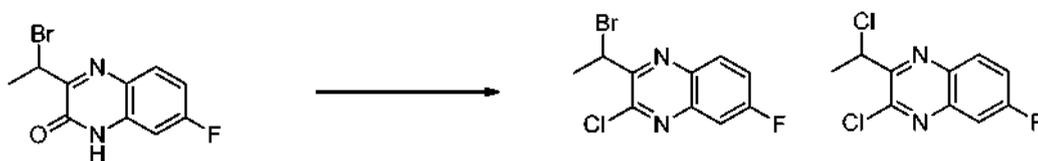
3-(1-Bromoetil)-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona

40 3-Etil-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona (20,61 g, 107,2 mmol) y 1,3-dibromo-5,5-dimetilhidantoína (18,77 g, 64,34 mmol) se suspendieron en tetracloruro de carbono (1072 ml, 107,2 mmol). A la mezcla heterogénea se añadió peróxido de benzoílo (3,463 g, 10,72 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo con agitación (temperatura del baño de aceite: 80 °C) durante 20 h. Después de 20 h, la mezcla se enfrió a ta. Después de un periodo de refrigeración, la mezcla se vertió en una solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (1 l) con agitación. El precipitado se recogió por filtración y se lavó con agua (1 l) para dar 3-(1-bromoetil)-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona (23,19 g, rendimiento de un 79,8 %) en forma de un sólido de color castaño: 45 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,68 (s. a., 1 H.), 7,85 (dd, *J* = 9,0, 5,9 Hz, 1 H), 7,19 (td, *J* = 8,8, 2,7 Hz, 1 H),

7,05 (dd, $J = 9,8, 2,7$ Hz, 1 H), 5,62 (c, $J = 6,7$ Hz, 1 H), 1,99 (d, $J = 6,7$ Hz, 3 H), puro en ~90 %
Espectro de Masas (ESI) $m/e = 271,0 [M + H (^{79}\text{Br})]^+$ y $273,0 [M + H (^{81}\text{Br})]^+$.

2-(1-Bromoetil)-3-cloro-6-fluoroquinoxalina
3-Cloro-2-(1-cloroetil)-6-fluoroquinoxalina

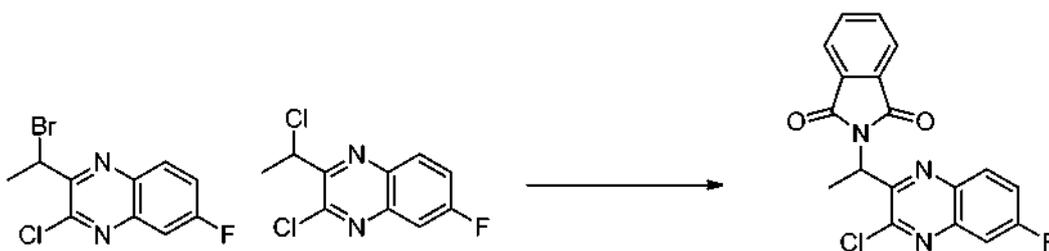
5



Una mezcla heterogénea de 3-(1-bromoetil)-7-fluoroquinoxalin-2(1H)-ona (58,86 g, 217,1 mmol) y oxocloruro de fósforo (198,8 ml, 2171 mmol) en un matraz de fondo redondo de 1 l se agitó a 100 °C durante 2 h. La mezcla era heterogénea al comienzo de la reacción y a continuación se convierte en una solución homogénea de color negro durante 1 h. Después de 2 h, la mezcla se enfrió a ta y se concentró a presión reducida. agresivo de color negro se le añadió hielo (~ 400 ml) con cuidado en porciones y a continuación agua (200 ml) con agitación. La mezcla se neutralizó con NH_4OH (200 ml) y hielo (~ 200 ml) con agitación. El precipitado resultante se recogió por filtración, se aclaró con agua (1 l), y se secó a alto vacío durante una noche para dar 2-(1-bromoetil)-3-cloro-6-fluoroquinoxalina (58,31 g, rendimiento de un 92,8 %) incluyendo 3-cloro-2-(1-cloroetil)-6-fluoroquinoxalina en forma de un sólido de color l. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), proporción de análogo de bromoetil y análogo de cloroetil = 2,5:1 Espectro de Masas (ESI) $m/e = 288,9 [M + H (^{79}\text{Br})]^+$ y $291,0 [M + H (^{81}\text{Br})]^+$

2-(1-(3-Cloro-6-fluoroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona

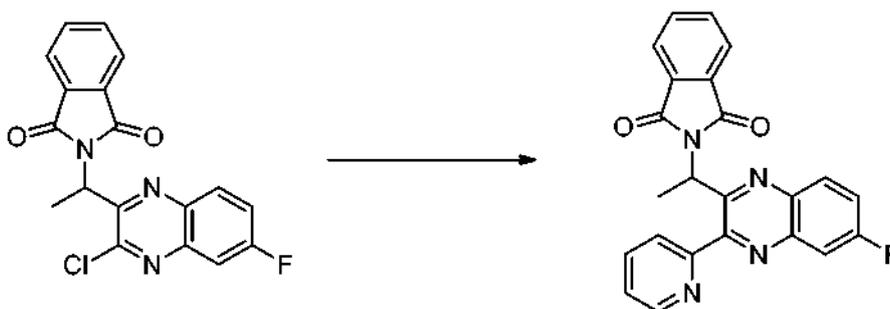
20



A una mezcla de 2-(1-bromoetil)-3-cloro-6-fluoroquinoxalina (57,17 g, 197,5 mmol) que contenía 3-cloro-2-(1-cloroetil)-6-fluoroquinoxalina (48,39 g, 197,5 mmol) en N,N -dimetilformamida (700,0 ml, 197,5 mmol) se añadió ftalimida potásica (91,43 g, 493,6 mmol) a ta y la mezcla se agitó a ta durante 1 h. Después de 1 h, a la mezcla se le añadió agua (2 l). La mezcla se extrajo con DCM (500 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1 l x 1), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron, y se concentraron a presión reducida para dar un líquido de color rojo. El líquido de color rojo se filtró a través de un lecho de sílice (14 cm de diámetro x 12,7 cm de altura), y se eluyó con un 20 % de EtOAc en hexano, a continuación con un 30 % de EtOAc en hexano, y a continuación con un 100 % de EtOAc como eluyente para dar dos fracciones. Segunda fracción, producto deseado 2-(1-(3-cloro-6-fluoroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (53,367 g, rendimiento de un 75,97 %) en forma de un sólido de color rosa. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8,25 (dd, $J = 9,4, 5,9$ Hz, 1 H), 7,81 - 7,95 (m, 6 H), 5,86 (c, $J = 6,8$ Hz, 1 H), 1,86 (d, $J = 7,0$ Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) $m/e = 356,0 (M + 1)$.

35

2-(1-(6-Fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona

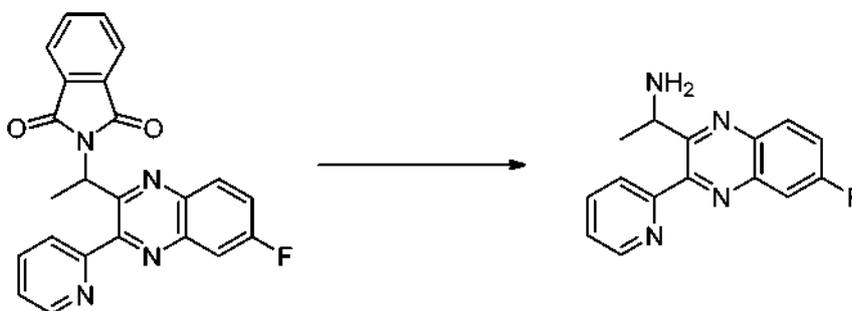


Una solución de 2-(1-(3-cloro-6-fluoroquinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (50,14 g, 140,9 mmol), 2-tri-n-butilestaniipiridina (pura al 80 %) (76,95 ml, 211,4 mmol), y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (0) (16,29 g, 14,09 mmol)

40

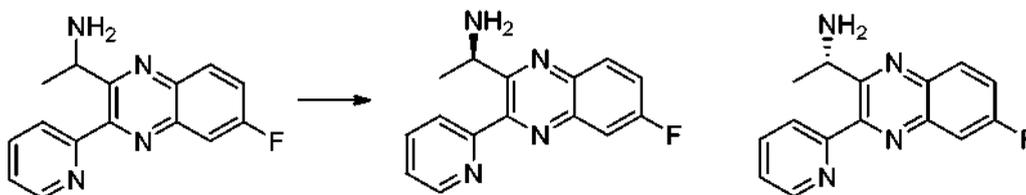
en 1,4-dioxano (1175 ml, 140,9 mmol) se agitó a 110 °C durante 29 h. Después de 29 h, la mezcla se enfrió a ta y se concentró a presión reducida para dar un sólido con consistencia de jarabe de color verde. Al residuo se añadió DCM (200 ml). La mezcla se calentó a reflujo durante 20 min y a continuación se enfrió a 0 °C con agitación. El sólido se recogió por filtración y se lavó con EtOAc-hexano (1:5, 500 ml) para dar el producto deseado (52,82 g, rendimiento de un 94,07 %). El sólido de color marrón oscuro se disolvió en CH₂Cl₂:MeOH (9:1, 400 ml, caliente), se filtró a través de un lecho de gel de sílice (150 g, 8,5 cm de diámetro x 5,5 cm de altura) para retirar el paladio residual y se lavó con CH₂Cl₂:MeOH (9:1, 600 ml). El filtrado se concentró a presión reducida para dar un sólido de color marrón (49,94 g, rendimiento de un 88,9 %). El sólido de color marrón se suspendió en EtOAc-hexano (1:9, 400 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 40 min. La mezcla se enfrió a ta, se filtró, se lavó con EtOAc-hexano (1:9, 600 ml), y se secó para dar el producto deseado 2-(1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (47,76 g, rendimiento de un 85,06 %) en forma de un sólido de color castaño. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,47 - 8,53 (m, 1 H), 8,20 (dd, *J* = 9,4, 5,9 Hz, 1 H), 7,94 (dd, *J* = 9,4, 2,7 Hz, 1 H), 7,85 (td, *J* = 8,9, 2,9 Hz, 1 H), 7,64 - 7,80 (m, 6 H), 7,30 - 7,37 (m, 1 H), 6,42 (c, *J* = 6,9 Hz, 1 H), 1,76 (d, *J* = 7,0 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 399,1 (*M* + 1).

1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina



A una mezcla heterogénea de 2-(1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etil)isoindolin-1,3-diona (47,26 g, 118,6 mmol) en etanol (768,3 ml, 118,6 mmol) se añadió hidrazina, monohidrato (28,77 ml, 593,1 mmol) y la mezcla se agitó a 95 °C durante 1 h. La mezcla de reacción heterogénea continuaba en solución después de 15 min, pero fue seguido de un precipitado de color blanco voluminoso. Después de 1 h, la mezcla se enfrió a ta. El precipitado se separó con una espátula, se filtró y se lavó con EtOAc (porciones de 3 x 250 ml). El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió de nuevo en EtOAc (600 ml) y agua (300 ml). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (100 ml x 3). Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar 1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina (30,95 g, rendimiento de un 97,25 %) en forma de un sólido de color marrón. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,75 (dc, *J* = 4,7, 0,9 Hz, 1 H), 8,20 (dd, *J* = 9,0, 5,9 Hz, 1 H), 7,98 - 8,11 (m, 2 H), 7,91 (dd, *J* = 9,4, 2,7 Hz, 1 H), 7,78 - 7,86 (m, 1 H), 7,56 - 7,61 (m, 1 H), 4,66 (c, *J* = 6,7 Hz, 1 H), 2,08 (s. a., 2 H), 1,35 (d, *J* = 6,7 Hz, 3 H). Espectro de Masas (ESI) *m/e* = 269,0 (*M* + 1). [HPLC Quiral] (columna Chiralpak AD-H, 0,46 x 250 mm, 5 μm) usando un 10 % isocrático de isopropanol en hexano como eluyente: dos picos a 9,350 min y a 10,678 min a 254 nm, (columna Chiralpak OD-H, 0,46 x 250 mm, 5 μm) usando un 10 % isocrático de isopropanol en hexano como eluyente: dos picos a 9,69 min y a 11,22 min a 254 nm.

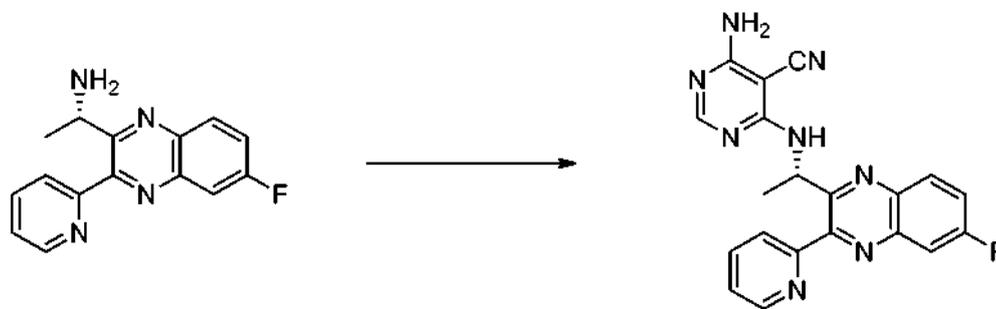
(S)-1-(6-Fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina (R)-1-(6-Fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina



Separación Quiral: La mezcla racémica (30,95 g) se sometió a separación quiral usando SFC. La muestra se disolvió en 800 ml de MeOH (+ traza de TFA), 1,3 ml de solución de muestra, es decir 50,3 mg cada inyección en el sistema de separación. La cromatografía de fluido supercrítico Semi-Prep (SFC) se realizó usando un Thar 350 SFC (presión de salida: 12 MPa, a 327 nm) con una: columna de AS-H, 250 x 30 mm (5 micrómetros) Fase Móvil: 36 g/min de MeOH (DEA al 0,2%) más 54 g/min CO₂ (Temp. = 22 °C) Después de separación quiral, cada fracción se co-evaporó dos veces con tolueno y etanol para retirar dietilamina. Primer Pico en columna de AS-H y segundo pico en columna de AD-H (10,678 min): (R)-1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina (13,5173 g, 50,4 mmol, rendimiento de un 43,7 %) en forma de un sólido de color marrón. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm

8,76 (dc, $J = 4,7$, 0,9 Hz, 1 H), 8,20 (dd, $J = 9,0$, 5,9 Hz, 1 H), 7,99 - 8,10 (m, 2 H), 7,91 (dd, $J = 9,4$, 2,7 Hz, 1 H), 7,82 (td, $J = 8,9$, 2,9 Hz, 1 H), 7,56 - 7,61 (m, 1 H), 4,66 (c, $J = 6,7$ Hz, 1 H), 2,07 (s, 2 H), 1,35 (d, $J = 6,7$ Hz, 3 H), contenía óxido de trifenilfosfina; Espectro de Masas (ESI) $m/e = 269,0$ ($M + 1$). [HPLC] un pico a 4,996 min, puro al 99,56 % a 254 nm; [HPLC Quiral] (columna Chiralpak AD-H, 0,46 x 250 mm, 5 mm) usando un 10 % isocrático de isopropanol en hexano como eluyente: un pico a 11,432 min (segundo enantiómero de elución) a 254 nm; [Análisis de Exceso Enantiomérico]: ee de un 99 %, primer enantiómero de elución en columna AS-H. Segundo pico en columna AS-H y primer pico en columna AD-H (9,350 min): (S)-1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina (12,6738 g, 47,2 mmol, rendimiento de un 40,9 %) en forma de un sólido con consistencia de jarabe de color marrón: RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8,73 - 8,78 (m, $J = 4,8$, 1,2, 0,9, 0,9 Hz, 1 H), 8,20 (dd, $J = 9,4$, 5,9 Hz, 1 H), 7,99 - 8,10 (m, 2 H), 7,91 (dd, $J = 9,4$, 2,7 Hz, 1 H), 7,82 (td, $J = 8,9$, 2,9 Hz, 1 H), 7,58 (ddd, $J = 7,4$, 4,9, 1,4 Hz, 1 H), 4,66 (c, $J = 6,4$ Hz, 1 H), 2,07 (s a, 2 H), 1,35 (d, $J = 6,7$ Hz, 3 H); Espectro de Masas (ESI) $m/e = 269,0$ ($M + 1$). [HPLC Quiral] (columna Chiralpak AD-H, 0,46 x 250 mm, 5 mm) usando 10 % isocrático de isopropanol en hexano como eluyente: un pico 9,135 min (primer enantiómero de elución) a 254 nm; [Análisis de Exceso Enantiomérico]: ee de un 98,86 %, segundo enantiómero de elución en una columna AS-H. La estereoquímica se confirmó como isómero S en la siguiente etapa.

(S)-4-Amino-6-((1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etil)amino)-pirimidin-5-carbonitrilo



Una mezcla de 4-amino-6-cloropirimidin-5-carbonitrilo (0,060 g, 0,39 mmol), (S)-1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etanamina (0,105 g, 0,391 mmol), y N,N-diisopropiletilamina (0,205 ml, 1,17 mmol) en butan-1-ol (3,91 ml) se agitó a 120 °C durante 3 h. Después de 3 h, la mezcla se retiró del calor y se dejó a ta. La mezcla se concentró a presión reducida para dar un sólido de color amarillo. Al sólido de color amarillo se le añadió agua (30 ml). El sólido resultante se filtró, se lavó con agua (30 ml), seco al aire para dar el producto en forma de un sólido de color marrón. El sólido de color marrón se purificó por cromatografía en columna en 40 g de una columna Redi-Sep usando un gradiente de 0 a 50 % de CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (89:9:1) en CH_2Cl_2 durante 14 min y a continuación un 50 % isocrático de CH_2Cl_2 :MeOH: NH_4OH (89:9:1) en CH_2Cl_2 durante 14 min como eluyente para dar un sólido de color amarillo claro (0,1246 g). El sólido de color amarillo claro se suspendió en EtOAc-hexano (1:4), se filtró y se secó para dar (S)-4-amino-6-((1-(6-fluoro-3-(piridin-2-il)quinoxalin-2-il)etilamino)pirimidin-5-carbonitrilo (0,1121 g, 0,290 mmol, rendimiento de un 74,1 %) en forma de un sólido de color marrón. RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 8,66 - 8,74 (m, 1 H), 8,19 (dd, $J = 9,4$, 5,9 Hz, 1 H), 7,99 - 8,09 (m, 2 H), 7,95 (dd, $J = 9,4$, 2,7 Hz, 1 H), 7,80 - 7,89 (m, 2 H), 7,70 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H), 7,53 (ddd, $J = 6,9$, 5,0, 1,8 Hz, 1 H), 7,20 (s a, 2 H), 6,09 - 6,21 (m, 1 H), 1,54 (d, $J = 6,7$ Hz, 3 H); Espectro de Masas (ESI) $m/e = 387,1$ ($M + 1$). [HPLC Quiral] (columna Chiralpak AD-H, 0,46 x 250 mm, 5 mm) usando 10 % de isocrático de isopropanol en hexano como eluyente: un pico a 16,038 min a 254 nm.

Ensayos Biológicos

40 Expresión recombinantes de las PI3K

Las subunidades de p110 de longitud completa de PI3k α , β y δ , etiquetadas de forma N-terminal con etiqueta de poliHis, se coexpresaron con p85 con vectores de expresión de Baculo virus en células de insecto sf9. Los heterodímeros P110/p85 se purificaron por Ni-NTA secuencial, Q-HP, cromatografía Superdex-100. Las isoenzimas α , β y δ purificadas se almacenaron a -20 °C en Tris 20 mM, pH 8, NaCl 0,2 M, glicerol al 50 %, DTT 5 mM, colato de Na 2 mM. La PI3K γ truncada, los restos 114-1102, etiquetados de forma N-terminal con etiqueta de poliHis, se expresaron con Baculo virus en células de insecto Hi5. La isoenzima γ se purificó por Ni-NTA secuencial, Superdex-200, cromatografía de Q-HP. La isoenzima γ se almacenó congelada a -80 °C en NaH_2PO_4 , pH 8, NaCl 0,2 M, etilenglicol al 1 %, β -mercaptoetanol 2 mM.

	Alfa	Beta	Delta	Gamma
Tris 50 mM	pH 8	pH 7,5	pH 7,5	pH 8
MgCl ₂	15 mM	10 mM	10 mM	15 mM

	Alfa	Beta	Delta	Gamma
Colato de Na	2 mM	1 mM	0,5 mM	2 mM
DTT	2 mM	1 mM	1 mM	2 mM
ATP	1 uM	0,5 uM	0,5 uM	1 uM
PIP2	ninguno	2,5 uM	2,5 uM	ninguno
tiempo	1 h	2 h	2 h	1 h
[Enzima]	15 nM	40 nM	15 nM	50 nM

Ensayos enzimáticos *in vitro*

5 Los ensayos se realizaron en 25 μ l con las concentraciones finales mencionadas anteriormente de componentes en placas de polipropileno de color blanco (Costar 3355). El fosfoaceptor de fosfatidil inositol, PtdIns(4,5)P₂ P4508, era de Echelon Biosciences. La actividad de ATPasa de las isoenzimas alfa y gamma no estaba estimulada en gran medida con PtdIns(4,5)P₂ en estas condiciones y por lo tanto se omitió del ensayo de estas isoenzimas. Los compuestos de ensayo se disolvieron en dimetilsulfóxido y se diluyeron con diluciones en serie tres veces. El compuesto en DMSO (1 μ l) se añadió por pocillo de ensayo, y la inhibición relativa a reacciones que no contenían compuesto, con y sin enzimas se determinó. Después de incubación de ensayo a ta, la reacción se detuvo y el ATP residual se determinó mediante la adición de un volumen igual de un kit de bioluminiscencia de ATP comercial (Perkin Elmer EasyLite) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se detectó usando un luminómetro AnalystGT.

15 Estimular la proliferación de linfocitos B humanos con anti-IgM

Aislar linfocitos humanos B:

20 Las PBMC aisladas de Leukopac o de sangre recién extraída humana. Aislar linfocitos B humanos usando el protocolo Miltenyi y el kit II de aislamiento de linfocitos B - los linfocitos B humano se purificaron usando columna de AutoMacs.

Activación de linfocitos B humanos

25 Usar placa de fondo plano de 96 pocillos, linfocitos B purificados en placa 50000/pocillo en medio de proliferación de linfocitos B (DMEM + FCS al 5 %, Hepes 10 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M); 150 μ l de medio que contiene 250 ng/ml de CD40L - proteína recombinante LZ (Amgen) y 2 μ g/ml de anticuerpo IgM anti-Humano (Jackson ImmunoResearch Lab. n.º 109-006-129), mezclado con 50 μ l de medio de linfocitos B que contiene inhibidores de PI3K e incubar 72 h a 37 °C en incubadora. Después de 72 h, pulsar el etiquetado de linfocitos B con 0,5-1 uCi/pocillo de ³H timidina durante una noche ~18 h, y cosechar células usando cosechador TOM.

Estimular la proliferación de linfocitos B humanos con IL-4

Aislar linfocitos B humanos:

35 Aislar las PBMC humanas a partir de Leukopac o de sangre recién extraída humana. Aislar los linfocitos B usando el protocolo Miltenyi - kit de aislamiento de linfocitos B. Los linfocitos B humanos se purificaron con columna AutoMacs.

Activación de linfocitos B humanos

40 Usar placa de fondo plano de 96 pocillos, linfocitos B purificados en placa 50000/pocillo en medio de proliferación de linfocitos B (DMEM + FCS al 5 %, 2-mercaptoetanol 50 μ M, Hepes 10 mM). El medio (150 μ l) contiene 250 ng/ml de CD40L - proteína recombinante LZ (Amgen) y 10 ng/ml de IL-4 (R&D system n.º 204-IL-025), mezclado con 50 150 μ l de medio de linfocitos B que contienen compuestos e incubar 72 h a 37 °C en incubadora. Después de 72 h, pulsar el etiquetado de linfocitos B con 0,5-1 uCi/pocillo de ³H timidina durante una noche ~18 h, y cosechar células usando cosechador TOM.

Ensayos de proliferación de PBMC humanas inducida por antígeno T (toxoides del tétanos) específico

50 Las PBMC humanas se preparan a partir de reservas congeladas o se purifican a partir de sangre humana recién extraída usando un gradiente Ficoll. Usar placa de fondo redondo de 96 pocillos y placa de 2 x 10⁵ PBMC/pocillo con medio de cultivo (RPMI 1640 + FCS al 10 %, 2-Mercaptoetanol 50 uM, Hepes 10 mM). Para determinaciones de Cl₅₀, los inhibidores de PI3K se sometieron a ensayo a partir de 10 μ M a 0,001 μ M, en incrementos semilogarítmicos y por triplicado. El toxoide del tétanos, antígeno específico de linfocitos T (Universidad de Massachusetts Lab) se

añadió a 1 µg/ml y se incubó 6 días a 37 °C en incubadora. Los sobrenadantes se recogen después de 6 días para ensayo de IL2 ELISA, a continuación las células se pulsan con ³H-timidina durante ~18 h para medir la proliferación.

Ensayos de GFP para detectar la inhibición de PI3K de Clase Ia y Clase III

5 AKT1 (PKBa) está regulada por la PI3K de Clase Ia activada por factores mitogénicos (IGF-1, PDGF, insulina, trombina, NGF, etc.). Como respuesta a los estímulos mitogénicos, AKT se transloca desde el citosol a la membrana plasmática

10 Forkhead (FKHRL1) es un sustrato para AKT. Es citoplasmático cuando se fosforila por AKT (supervivencia/crecimiento). La inhibición de AKT (estasis/apoptosis) - translocación forkhead a los dominios FYVE del núcleo que se unen a PI(3)P. La mayor parte está generada por acción constitutiva de PI3K de Clase III.

Ensayo de alteración de membrana AKT (células CHO-IR-AKT1-EGFP/GE Healthcare)

15 Lavar las células con tampón de ensayo. Tratar con compuestos en tampón de ensayo 1 h. Añadir 10 ng/ml de insulina. Fijar después de 10 min a temperatura ambiente y formar imágenes.

Ensayo de translocación Forkhead (células MDA MB468 Forkhead-Diversa GFP)

20 Tratar las células con compuesto en medio de crecimiento 1 h. Fijar y formar imágenes.

Ensayo de PI(3)P de Clase III (células U2OS EGFP-2XFYVE /GE Healthcare)

25 Lavar las células con tampón de ensayo. Tratar con compuestos en tampón de ensayo 1 h. Fijar y formar imágenes.

El control para los 3 ensayos es Wortmanina 10 µM:

AKT es citoplasmático

Forkhead es nuclear

30 PI(3)P suprimido de endosomas

Ensayo de biomarcador: estimulación del receptor de linfocitos B de expresión de CD69 o B7.2 (CD86)

35 La sangre completa humana heparinizada se estimuló con 10 µg/ml de anti-IgD (Southern Biotech, n.º 9030-01). A continuación se tomaron alícuotas de 90 µl de la sangre estimulada por pocillo de una placa de 96 pocillos y se trató con 10 µl de diversas concentraciones de compuesto de bloqueo (de 10-0,0003 µM) diluido en IMDM + FBS al 10 % (Gibco). Las muestras se incubaron juntas durante 4 h (para expresión de CD69) durante 6 h (para expresión de B7.2) a 37 °C. La sangre tratada (50 µl) se transfirió alguna placa de pocillo profundo, de 96 pocillos (Nunc) para tinción de anticuerpo con 10 µl cada uno de CD45-PerCP (BD Biosciences, n.º 347464), CD19-FITC (BD Biosciences, n.º 340719), y CD69-PE (BD Biosciences, n.º 341652). Los segundos 50 µl de la sangre tratada se transfirieron alguna segunda placa de pocillo profundo de 96 pocillos para tinción de anticuerpo con 10 µl cada uno de CD19-FITC (BD Biosciences, n.º 340719) y CD86-PeCy5 (BD Biosciences, n.º 555666). Todas las tinciones se realizaron durante 15-30 min en la oscuridad a ta. A continuación, la sangre se lisó y se fijó usando 450 µl de solución de lisado de FACS (BD Biosciences, n.º 349202) durante 15 min a ta. A continuación, las muestras se lavaron 2X en PBS + FBS al 2 % antes del análisis de FACS. Las muestras se seleccionaron en cualquiera de células doble positivas CD45/CD19 para tinción de CD69, o células positivas CD 19 para tinción de CD86.

Contraidentificación sistemática Gamma: Estimulación de monocitos humanos para expresión de fosfo-AKT

50 Una línea de células de monocitos humanos, THP-1, se mantuvo en RPMI + FBS al 10 % (Gibco). Un día antes de la estimulación, se hizo recuento de las células usando exclusión con azul de tripano en un hemocitómetro y se suspendieron a una concentración de 1×10^6 células por ml de medios. A continuación, se tomaron alícuotas de 100 µl de células más medios (1×10^5 células) por pocillo de placas de fondo profundo de 4-96 pocillos (Nunc) para someter a ensayo ocho compuestos diferentes. Las células reposaron durante una noche antes del tratamiento con diversas concentraciones (de 10-0,0003 µM) de compuesto de bloqueo. El compuesto diluido en medios (12 µl) se añadió a las células durante 10 min a 37 °C. MCP-1 humano (12 µl, R&D Diagnostics, n.º 279-MC) se diluyó en medios y se añadió a cada pocillo hasta una concentración final de 50 ng/ml. La estimulación duró 2 min a ta. Se añadió tampón FACS Phosflow Lyse/Fix calentado previamente (1 ml a 37 °C) (BD Biosciences, n.º 558049) a cada pocillo. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 10-15 min. Las placas centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se retiró por aspiración, y se añadió 1 ml de MEOH al 90 % enfriado con hielo a cada pocillo con agitación vigorosa. A continuación, las placas se incubaron durante una noche a -70 °C o en hielo durante 30 min antes de la tinción del anticuerpo. Las patas se centrifugaron y se lavaron 2X en PBS + FBS al 2 % (Gibco). El lavado se aspiró y las células se suspendieron en el tampón restante. Se añadió pAKT de conejo (50 µl, Cell Signaling, n.º 4058L) a 1:100, a cada muestra durante 1 h a ta con agitación. Las células se lavaron y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se aspiró y las células se suspendieron en el tampón restante. El anticuerpo secundario, Alexa 647 anti-conejo de cabra (50 µl, Invitrogen, n.º A21245) a

1:500, se añadió durante 30 min a ta con agitación. A continuación, las células se lavaron 1X en tampón y se suspendieron en 150 µl de tampón para análisis de FACS. Es necesario dispersar las células muy bien mediante pipeteo antes de la realización en citómetro de flujo. Las células se desarrollaron en un LSRII (Becton Dickinson) y se seleccionaron en dispersión directa y lateral para determinar los niveles de expresión de pAKT en la población de monocitos.

Contraidentificación sistemática Gamma: Estimulación de monocitos para expresión de fosfo-AKT en médula ósea de ratón

Los fémures de ratón se diseccionaron a partir de cinco ratones BALB/c hembra (Charles River Labs.) y se recogieron en medio de RPMI + FBS al 10 % (Gibco). La médula ósea del ratón se retiró cortando los extremos del fémur y lavando abundantemente con 1 ml de medio usando una aguja de calibre 25. A continuación, la médula ósea se dispersó en medio usando una aguja de calibre 21. El volumen del medio aumentó hasta 20 ml y se hizo el recuento de las células usando exclusión azul de tripano en un hemocitómetro. A continuación, la suspensión celular aumentó a $7,5 \times 10^6$ células por 1 ml de medio y se tomaron alícuotas de 100 µl ($7,5 \times 10^5$ células) por pocillo en placas de pocillo profundo, de 4-96 pocillos (Nunc) para someter al ensayo ocho compuestos diferentes. Las células se dejaron en reposo a 37 °C durante 2 h antes del tratamiento con diversas concentraciones (de 10-0,0003 µM) de compuesto de bloqueo. El compuesto diluido en medio (12 µl) se añadió a células de médula ósea durante 10 min a 37 °C. El MCP-1 de ratón (12 µl, R&D Diagnostics, n.º 479-JE) se diluyó en medio y se añadió a cada pocillo hasta una concentración final de 50 ng/ml. La estimulación duró 2 min a ta. A cada pocillo se añadió 1 ml de tampón FACS Phosflow Lyse/Fix calentado previamente a 37 °C (BD Biosciences, n.º 558049). A continuación, las placas se incubaron a 37 °C durante un periodo adicional de 10-15 min. Las placas se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se retiró por aspiración y se añadió 1 ml de MEOH al 90 % enfriado con hielo a cada pocillo con agitación vigorosa. A continuación, las placas se incubaron bien durante una noche a -70 °C o bien en hielo durante 30 min antes de la tinción de anticuerpo. Las placas se centrifugaron y se lavaron 2X en PBS + FBS al 2 % (Gibco). El lavado se aspiró y las células se suspendieron en el tampón restante. El bloqueo de Fc (2 µl, BD Pharmingen, n.º 553140) se añadió a continuación por pocillo durante 10 min a ta. Después del bloqueo, 50 µl de anticuerpos primarios se diluyeron en tampón; CD11b-Alexa488 (BD Biosciences, n.º 557672) a 1:50, CD64-PE (BD Biosciences, n.º 558455) a 1:50, y pAKT de conejo (Cell Signaling, n.º 4058L) a 1:100, se añadieron a cada muestra durante 1 h a TA con agitación. El tampón de lavado se añadió a las células y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se aspiró y las células se suspendieron en el tampón restante. El anticuerpo secundario; Alexa 647 anti-conejo de cabra (50 µl, Invitrogen, n.º A21245) a 1:500, se añadió durante 30 min a ta con agitación. A continuación, las células se lavaron 1X en tampón y suspendieron en 100 µl de tampón para análisis de FACS. Las células se desarrollaron en LSRII (Becton Dickinson) y se sometieron la selección en células CD11b/CD64 doble positivas para determinar los niveles de expresión de pAKT en la población de monocitos.

Ensayo *in vivo* de pAKT

El vehículo y los compuestos se administran p.o. (0,2 ml) mediante sonda (Oral Gavage Needles Popper & Sons, New Hyde Park, NY) a ratones (Línea 3751 Transgénica, hembra, 10-12 semanas, Amgen Inc, Thousand Oaks, CA) 15 min antes de la inyección i.v (0,2 ml) de FITC anti-IgM (50 ug/ratón) (Jackson Immuno Research, West Grove, PA). Después de 45 min, los ratones se sacrifican dentro de una cámara de CO₂. La sangre se extrae a través de punción cardiaca (0,3 ml) (Jeringas de 1 cc y 25 g, Sherwood, St. Louis, MO) y se transfieren en un vial cónico de 15 ml (Nalge/Nunc International, Dinamarca). La sangre se fija inmediatamente con 6,0 ml de Tampón BD Phosflow Lyse/Fix (BD Bioscience, San Jose, CA), se invierte 3X y se coloca en un baño de agua a 37 °C. La mitad del bazo se retira y se transfiere a un tubo eppendorf que contiene 0,5 ml de PBS (Invitrogen Corp, Grand Island, NY). El bazo se tritura usando un triturador de tejidos (Pellet Pestle, Kimble/Kontes, Vineland, NJ) y se fija inmediatamente con 6,0 ml de tampón BD Phosflow Lyse/Fix, se invierte 3X y se coloca en un baño de agua a 37 °C. Una vez que los tejidos se han recogido con el ratón se disloca por vía cervical y el esqueleto se descarta. Después de 15 min, los viales cónicos de 15 ml se retiran del baño de agua a 37 °C y se colocan en hielo hasta que los tejidos se procesan adicionalmente. Los bazos triturados se filtran a través de un filtro celular de 70 µm (BD Bioscience, Bedford, MA) en otro vial cónico de 15 ml y se lavan con 9 ml de PBS. Los esplenocitos y la sangre se centrifugan @ 2.000 rpms durante 10 min (frío) y el tampón se aspira. Las células se mueven a suspender en 2,0 ml de alcohol metílico al 90 % frío (-20 °C) (Mallinckrodt Chemicals, Phillipsburg, NJ). El MeOH se añade lentamente mientras que el vial cónico se somete a agitación vorticial rápidamente. A continuación, los tejidos se almacenan a -20 °C hasta que las células se pueden teñir para análisis de FACS.

Inmunización de TNP con múltiples dosis

La sangre se recogió mediante extracciones retro-orbital del ojo de ratones hembra BALB/c de 7-8 semanas de edad (Charles River Labs.) el día 0 antes de la inmunización. Se permitió que la sangre coagulara durante 30 min y se centrifugó a 10.000 rpm en tubos Microtainer consuelo (Becton Dickinson) durante 10 min. Los sueros se recogieron, se tomaron alícuotas en tubos de Matrix (Matrix Tech. Corp.) y se almacenaron a -70 °C hasta que se realizó el ELISA. A los ratones se les administró compuesto por vía oral antes de inmunización y en periodos de tiempo posteriores basándose en el periodo de duración de la molécula. A continuación, los ratones inmunizaron con

5 cualquiera de 50 µg de TNP-LPS (Biosearch Tech., n.º T-5065), 50 µg de TNP-Ficoll (Biosearch Tech., n.º F-1300), o
 10 100 µg de TNP-KLH (Biosearch Tech., n.º T-5060) más alum al 1 % (Brenntag, n.º 3501) en PBS. Se preparó TNP-
 KLH más solución de alum invirtiendo suavemente la mezcla 3-5 veces cada 10 min durante 1 h antes de la
 15 inmunización. El día 5, después del último tratamiento, los ratones se sacrificaron con CO₂ y se hizo una función
 cardiaca. Se permitió que la sangre coagulada durante 30 min y se centrifugó a 10.000 rpm en tubos Microtainer con
 20 suero durante 10 min. Los sueros se recogieron, se tomaron alícuotas en tubos de Matrix, y se almacenaron a -70 °C
 hasta que se realizó el análisis adicional. Los niveles de IgG1, IgG2a, IgG3 e IgM específicos para TNP en los sueros
 se midieron a continuación mediante ELISA. El TNP-BSA (Biosearch Tech., n.º T-5050) se usó para capturar los
 anticuerpos específicos para TNP. El TNP-BSA (10 µg/ml) se usó para revestir las placas de ELISA de 384 pocillos
 (Corning Costar) durante una noche. A continuación, las placas se lavaron y se bloquearon durante 1 h usando la
 solución de Bloqueo para ELISA de BSA al 10 % (KPL). Después del bloqueo, las placas de ELISA se lavaron y las
 muestras/patrones de sueros se diluyeron en serie se permitió que se unieran a las placas durante 1 h. Las placas
 se lavaron y los anticuerpos secundarios conjugados con Ig-HRP (IgG1 anti-ratón de cabra, Southern Biotech n.º
 1070-05, IgG2a anti-ratón de cabra, Southern Biotech n.º 1080-05, IgM anti-ratón de cabra, Southern Biotech n.º
 1020-05, IgG3 anti-ratón de cabra, Southern Biotech n.º 1100-05) se diluyeron a 1:5000 y se incubaron en las placas
 durante 1 h. La solución de TMB peroxidasa (TMB de Reserva SureBlue de KPL) se usó para visualizar los
 anticuerpos. Las placas se lavaron y se permitió que las muestras se desarrollaran en la solución de TMB
 aproximadamente 5-20 min dependiendo de la Ig analizada. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 2 M y las
 placas se leyeron a una DO de 450 nm.

Ej n.º	Cl ₅₀ de PI3K d (mM)	Cl ₅₀ de PI3K b (mM)	Cl ₅₀ de PI3Ka (mM)	Cl ₅₀ de PI3Kg (mM)	PI3K: b/d	PI3K: a/d	PI3K: g/d
1	0,0030	4,7400	9,9800	1,6100	1580	3327	537
2	0,0078	1,3600	7,0400	0,8040	174	903	103
3	0,0051	0,4340	3,4200	0,0629	85	671	12
4	0,0100	0,5220	12,0600	0,4480	52	1206	45
5	0,0026	0,6520	5,1600	0,6200	251	1985	238
6	0,0070	5,8000	25,0000	2,8000	829	3571	400
7	0,0117	2,4900	12,7000	3,9000	213	1085	333

Ej n.º	en anti-IgM diana pAKT de esplenocitos mu (Hu esplenocitos PAKT)	PI3KIII, (uM)	PI3KbMDA468 FH PI3KbMBMDA468 (uM)	datos de pAKT <i>in vivo</i> , DE ₅₀ (uM) WB, esplenocitos
1	0,0022	>1 0	5,97,2,6	0,041, 0,010
2	0,0012	> 10	>10, 0,811	0,36, 0,26
3	0,0015	> 10	3,8000, 0,483	sin datos
4	0,0018	> 10	1,9500, 0,62	sin datos
5	0,0050	> 10	> 10, > 10	0,056, 0,012
6	0,0060	> 10	> 10, 11	0,13 (WB)
7	0,0104 (anti-IgM de Células Hu B)	> 10	> 10	sin datos

25 Para el tratamiento de enfermedades mediadas por PI3Kδ, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante,
 osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes, los compuestos
 de la presente invención se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral, mediante inhalación por
 pulverización, por vía rectal, o por vía tópica en formulaciones de unidad de dosificación que contienen excipientes,
 adyuvantes, y vehículos convencionales farmacéuticamente aceptables. El término parenteral como se usa en el
 presente documento incluye, técnicas subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal, de infusión o por vía
 30 intraperitoneal.

El tratamiento de enfermedades y trastornos en el presente documento también pretende incluir la administración
 profiláctica de un compuesto de la invención, una sal farmacéutica del mismo, o una composición farmacéutica de
 cualquiera de un sujeto (es decir, un animal, preferentemente un mamífero, lo más preferentemente un ser humano)

de que se cree que está en necesidad de tratamiento preventivo, tal como, por ejemplo, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes y similares.

5 El régimen de dosificación para el tratamiento de enfermedades mediadas por PBKS, cáncer, y/o hiperglucemia con los compuestos de la presente invención y/o composiciones de la presente invención se basa en una diversidad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, peso, sexo, afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración, y el compuesto en particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero se puede determinar de forma rutinaria usando métodos convencionales. Algunos niveles de dosificación en el orden de aproximadamente 0,01 mg a 30 mg por kilogramo de peso corporal al día, preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a 10 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 0,25 mg a 1 mg/kg son útiles para todos los métodos de uso desvelados en el presente documento.

15 Los compuestos farmacéuticamente activos de la presente invención se pueden procesar de acuerdo con métodos convencionales de farmacia para producir agentes medicinales para administración a pacientes, incluyendo seres humanos y otros mamíferos.

20 Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, una cápsula con un comprimido, una suspensión, o líquido. La composición farmacéutica se prepara preferentemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad dada del principio activo. Por ejemplo, éstas pueden contener una cantidad de principio activo de aproximadamente 1 a 2000 mg, preferentemente de aproximadamente 1 a 500 mg, más preferentemente de aproximadamente 5 a 150 mg. Una dosis diaria adecuada para un ser humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo de la afección del paciente y otros factores, pero, de nuevo, se puede determinar usando métodos de rutina.

25 El principio activo también se puede administrar mediante inyección con una composición con vehículos adecuados incluyendo solución salina, dextrosa, o agua. El régimen de dosificación parenteral diario será de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal total, preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg, y lo más preferentemente de aproximadamente 0,25 mg a 1 mg/kg.

30 Las preparaciones inyectables, tales como suspensiones ac. u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular de acuerdo con el uso de agentes conocidos adecuados de dispersión o agentes humectantes y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos de solventes aceptables que se pueden usar se encuentran agua, solución de Ringer, y solución isotónica de cloruro sódico. Además, algunos aceites no volátiles estériles se usan convencionalmente en forma de un medio disolvente o de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite no volátil insípido, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, algunos ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de agentes inyectables.

40 Para administración rectal del fármaco se pueden preparar supositorios mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado tal como manteca de cacao y polietilenglicoles que son sólidos a las temperaturas ordinarias pero líquidos a la temperatura del recto y por lo tanto se fundirán en el recto y liberarán el fármaco.

45 Una dosis tópica adecuada de principio activo de un compuesto de la invención es de 0,1 mg a 150 mg administrada de una a cuatro, preferentemente una o dos veces al día. Para administración tópica, el principio activo puede comprender de un 0,001 % a un 10 % en p/p, por ejemplo, de un 1 % a un 2 % en peso la formulación, aunque puede comprender tanto como un 10 % en p/p, pero preferentemente no más de un 5 % en p/p, y más preferiblemente de un 0,1 % a un 1 % de la formulación.

50 Algunas formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para penetración a través de la piel (por ejemplo, linimentos, lociones, pomadas, cremas o pastas) y gotas adecuadas para administración al ojo, oído, o nariz.

55 Para administración, los compuestos de la presente invención se combinan de forma habitual con uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración indicada. Los compuestos se pueden mezclar con lactosa, sacarosa, almidón en polvo, ésteres de celulosa de ácidos alcanoicos, ácido esteárico, talco, estearato de magnesio, óxido de magnesio, sales de sodio y calcio de ácidos fosfórico y sulfúrico, goma arábica, gelatina, alginato sódico, polivinil-pirrolidina, y/o alcohol de polivinilo, y pueden formar comprimidos o encapsular para administración convencional. Como alternativa, los compuestos de la presente invención se pueden disolver en solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, goma de tragacanto, y/o diversos tampones. En la técnica farmacéutica se conocen bien otros adyuvantes y modos de administración. El vehículo o diluyente puede incluir material de retardo de tiempo, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera, o u otros materiales bien conocidos en la técnica.

65

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar en una forma sólida (incluyendo gránulos, polvos o supositorios) o en una forma líquida (por ejemplo, soluciones, suspensiones, o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas se pueden someter a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, agentes emulgentes, tampones, etc.

Las formas de dosificación sólida para administración oral pueden incluir cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En formas de dosificación sólida de este tipo con el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa, o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, dado que es una práctica normal, sustancias adicionales distintas de diluyentes inertes, por ejemplo, agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. En el caso de cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponamiento. Además, se pueden preparar comprimidos y píldoras con revestimientos entéricos.

Las formas de dosificación líquida para administración oral pueden incluir emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados normalmente en la técnica, tales como agua. Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, edulcorantes, saborizantes y perfumantes.

Los compuestos de la presente invención pueden poseer uno o más átomos de carbono asimétricos y por lo tanto son capaces de existir en forma de isómeros ópticos así como en forma de mezclas racémicas o no racémicas de los mismos. Los isómeros ópticos se pueden obtener por resolución de las mezclas racémicas de acuerdo con procesos convencionales, por ejemplo, mediante formación de sales diastereoisoméricas, por tratamiento con un ácido o base ópticamente activos. Algunos ejemplos de ácidos apropiados son ácido tartárico, diacetiltartárico, dibenzoiltartárico, ditoluoltartárico, y canforsulfónico y a continuación separación de la mezcla de diaestereoisómeros mediante cristalización seguido de liberación de las bases ópticamente activas a partir de estas sales. Un proceso diferente para la separación de isómeros ópticos implica el uso de una columna de cromatografía quiral usada de forma óptima para maximizar la separación de los enantiómeros. Además, otro método disponible implica la síntesis de moléculas diastereoisoméricas covalentes por reacción de compuestos de la invención con un ácido ópticamente puro en una forma activada o un isocianato ópticamente puro. Los diaestereoisómeros sintetizados se pueden separar por medios convencionales tales como cromatografía, destilación, cristalización o sublimación, y a continuación se pueden hidrolizar para administrar el compuesto enantioméricamente puro. Los compuestos ópticamente activos de la invención se pueden obtener del mismo modo usando materiales de partida activos. Estos isómeros se pueden encontrar en forma de un ácido libre, una base libre, un éster o una sal.

De forma análoga, los compuestos de la presente invención pueden existir como isómeros, es decir, compuestos de la misma fórmula molecular pero en los que los átomos, con respecto los unos a los otros, se colocan de forma diferente. En particular, los sustituyentes de alquileo de los compuestos de la presente invención, se colocan normal y preferentemente y se insertan en las moléculas como se indica en las definiciones para cada uno de estos grupos, leyendo ser izquierda a derecha. Sin embargo, en ciertos casos, un experto en la materia observará que es posible preparar compuestos de la presente invención en los que los sustituyentes tienen una orientación invertida con respecto a los otros átomos en una molécula. Es decir, el sustituyente a insertar puede ser el mismo que el que se ha indicado anteriormente excepto en que está insertado en la molécula en la orientación inversa. Un experto en la materia observará que estas formas isoméricas de los compuestos de la presente invención se deben de interpretar como incluidas dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden usar en forma de sales derivadas de ácidos inorgánicos u orgánicos. Las sales incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metansulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, 2-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, mesilato, y undecanoato. Además, los grupos que contienen nitrógeno básico se pueden cuaternizar con agentes tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros e yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; sulfatos de dialquilo tales 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 aralquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De este modo se obtienen productos solubles en agua o en aceite o dispersables.

Algunos ejemplos de ácidos que se pueden usar para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Otros ejemplos incluyen sales con metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, calcio o magnesio o con bases orgánicas.

En el alcance de la presente invención también se incluyen ésteres farmacéuticamente aceptables de un grupo que contiene ácido carboxílico o hidroxilo, incluyendo un éster metabólicamente lábil o una forma de profármaco de un

compuesto de la presente invención. Un éster metabólicamente lábil es uno que puede producir, por ejemplo, un aumento en los niveles en sangre y prolongar la eficacia de la forma correspondiente del compuesto no esterificada. Una forma de profármaco es una que no está en una forma activa de la molécula como se administra pero que se convierte en terapéuticamente eficaz después de una cierta actividad o biotransformación *in vivo*, tal como metabolismo, por ejemplo, escisión enzimática o hidrolítica. Para una discusión general de profármacos que implican ésteres véase Svensson and Tunek Drug Metabolism Reviews 165 (1988) y Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985). Algunos ejemplos de un anión carboxilato enmascarado incluyen una diversidad de ésteres, tales como alquilo (por ejemplo, metilo, etilo), cicloalquilo (por ejemplo, ciclohexilo), aralquilo (por ejemplo, bencilo, p-metoxibencilo), y alquilcarboniloxialquilo (por ejemplo, pivaloiloximetilo). Algunas aminas se han enmascarado como derivados sustituidos con arilcarboniloximetilo que se extienden con esterases *in vivo* liberando el fármaco libre y formaldehído (Bundgaard J. Med. Chem. 2503 (1989)). Además, algunos fármacos que contienen un grupo NH ácido, tal como imidazol, imida, indol y similares, se han enmascarado con grupos N-aciloximetilo (Bundgaard Design of Prodrugs, Elsevier (1985)). Algunos grupos hidroxilo se han enmascarado como ésteres y éteres. El documento EP 039.051 (Sloan y Little, 4/11/81) desvela profármacos de base de Mannich y ácido hidroxámico, su preparación y uso. Algunos ésteres de un compuesto de la presente invención, pueden incluir, por ejemplo, los ésteres de metilo, etilo, propilo, y butilo, así como otros ésteres adecuados formados entre un resto ácido y un resto que contiene hidroxilo. Algunos ésteres metabólicamente lábiles, pueden incluir, por ejemplo, metoximetilo, etoximetilo, isopropoximetilo, α -metoxietilo, grupos tales como α -((alquiloxi C₁-C₄))etilo, por ejemplo, metoxietilo, etoxietilo, propoxietilo, iso-propoxietilo, etc.; grupos 2-oxo-1,3-dioxolen-4-ilmetilo, tales como 5-metil-2-oxo-1,3,dioxolen-4-ilmetilo, etc.; grupos alquiltiometilo C₁-C₃, por ejemplo, metiltiometilo, etiltiometilo, isopropiltiometilo, etc.; grupos aciloximetilo, por ejemplo, pivaloiloximetilo, α -acetoximetilo, etc.; etoxicarbonil-1-metilo; o grupos metilo sustituidos con α -aciloxi- α , por ejemplo α -acetoxietilo.

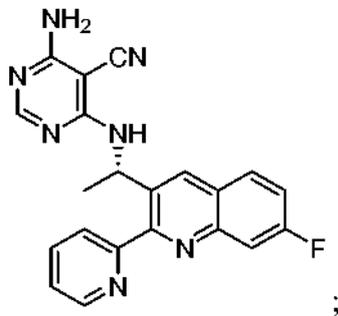
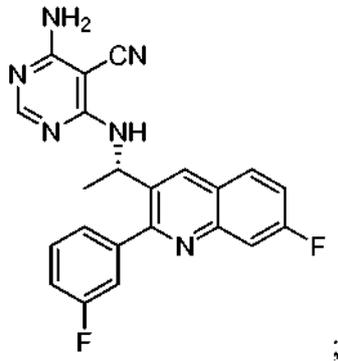
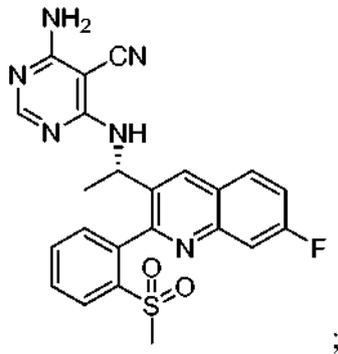
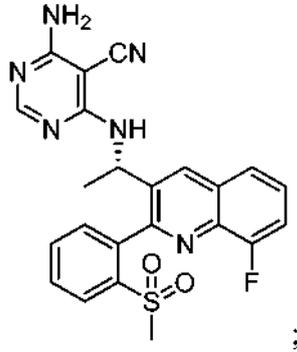
Además, los compuestos de la invención pueden existir como sólidos cristalinos que se pueden cristalizar a partir de disolventes comunes tales como etanol, N,N-dimetilformamida, agua, o similares. Por lo tanto, las formas cristalinas de los compuestos de la invención pueden existir como polimorfos, solvatos y/o hidratos de los compuestos precursores o sus sales farmacéuticamente aceptables. Del mismo modo, se debe interpretar que todas las formas de este tipo entran dentro del alcance de la invención.

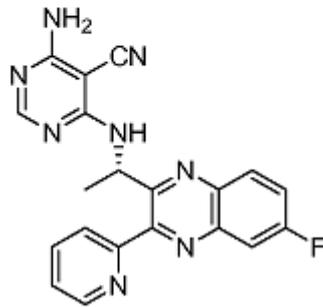
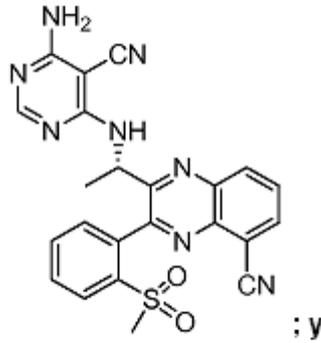
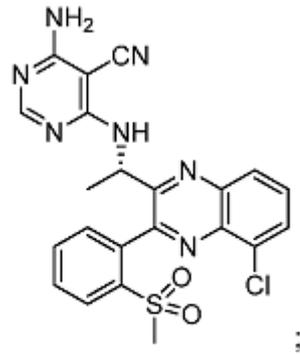
Aunque los compuestos de la invención se pueden administrar como el único agente farmacéutico activo, también se pueden usar en combinación con uno o más compuestos de la invención u otros agentes. Cuando se administran como una combinación, los agentes terapéuticos se pueden formular como composiciones separadas que se administran al mismo tiempo o en tiempos diferentes, o los agentes terapéuticos se pueden administrar como una sola composición.

35

REIVINDICACIONES

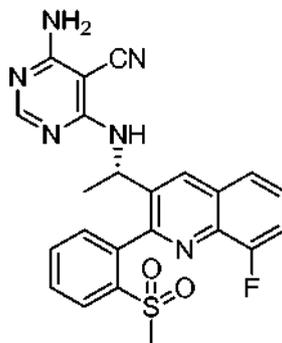
1. Un compuesto seleccionado entre





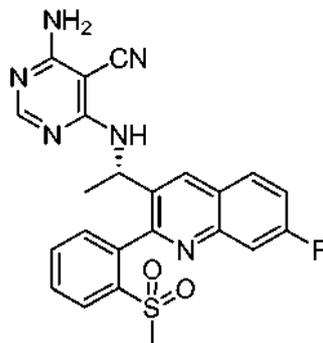
o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

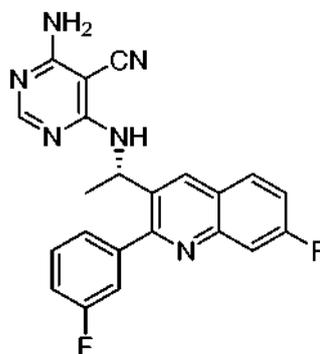
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

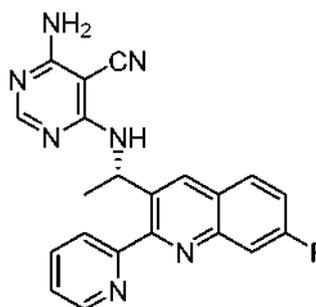
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

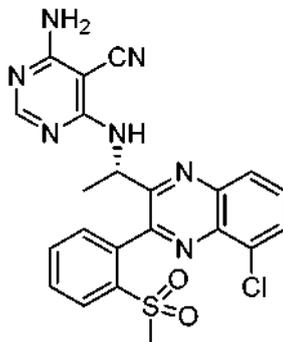
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

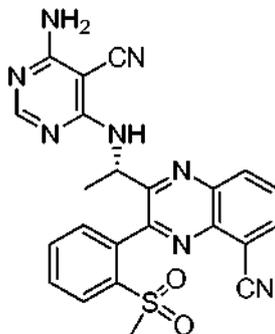
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5

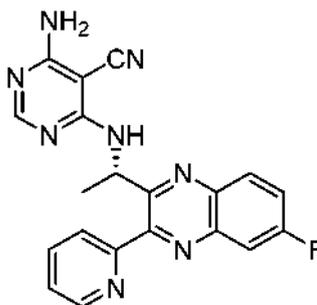
7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la estructura



o cualquier sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15

9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20

10. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

25

11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

13. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8; y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 16. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 15 17. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 20 18. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 25 19. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 30 20. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 35 21. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, lupus sistémico eritematoso (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 40 22. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, trastornos intestinales inflamatorios, trastornos oculares inflamatorios, trastornos de vejiga inflamatorios o inestables, afecciones de la piel con componentes inflamatorios, afecciones inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes, encefalomiелitis diseminada aguda (SLE), miastenia grave, artritis reumatoide, encefalomiелitis diseminada aguda, púrpura trombocitopénica idiopática, esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren y anemia hemolítica autoinmune, afecciones alérgicas e hipersensibilidad.
- 45 50 55 60