

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 792**

51 Int. Cl.:

**C07D 473/16** (2006.01)  
**C07D 473/34** (2006.01)  
**C07D 487/04** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61K 31/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2005** **E 13150110 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016** **EP 2612862**

54 Título: **Quinazolinona usada como inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa delta humana**

30 Prioridad:

**13.05.2004 US 570784 P**

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

**16.03.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FOWLER, KERRY W.;**  
**HUANG, DANWEN;**  
**KESICKI, EDWARD A.;**  
**OOI, HUA CHEE;**  
**OLIVER, AMY R.;**  
**RUAN, FUQIANG;**  
**TREIBERG, JENNIFER y**  
**PURI, KAMAL DEEP**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 605 792 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).

**Quinazolinona usada como inhibidor de la fosfatidilinositol 3-quinasa delta humana****5 Descripción:**

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 **[0001]** La presente invención se relaciona generalmente con enzimas de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), y más particularmente con inhibidores selectivos de la actividad de la PI3K y métodos de uso de tales inhibidores.

15 **[0002]** La señalización celular a través de los fosfoinositoles 3'-fosforilados se ha implicado en una variedad de procesos celulares, p.ej., transformación maligna, señalización del factor de crecimiento, inflamación e inmunidad (ver Rameh et al., J. Biol. Chem., 274:8347-8350 (1999) para una revisión). La enzima responsable para generar estos productos de señalización fosforilada es la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa; PI3K). La PI3K originalmente se identificó como una actividad asociada con oncoproteínas virales y tirosín quinazas del receptor del factor de crecimiento que fosforila el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el 3'-hidroxilo del anillo inositol (Panayotou et al., Trends Cell Biol 2:358-60 (1992)).

20 **[0003]** Los niveles de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el producto primario de la activación de la PI 3-quinasa, aumentan con el tratamiento de las células con una variedad de agonistas. Por tanto, se cree que la activación de la PI 3-quinasa está involucrada en un rango de respuestas celulares incluyendo el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Parker et al., Curr. Biol., 5:577-99 (1995); Yao et al., Science, 267:2003-05 (1995)). Aunque los blancos descendentes de los lípidos fosforilados generados luego de la activación de la PI 3-quinasa no se han caracterizado, la evidencia que está emergiendo sugiere que las proteínas del dominio homología pleckstrin y las proteínas que contienen el dominio FYVE-finger se activan cuando se unen a varios lípidos fosfatidilinositol (Sternmark et al., J. Cell. Sci., 122:4175-83 (1999); Lemmon et al., Trends Cell Biol., 7:237-42 (1997)). *In vitro*, se ha demostrado que algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) que son activadas directamente por el PIP3 y la proteína quinasa relacionada con la PKC, PKB, son activadas por la PI 3-quinasa (Burgering et al., Nature, 376:599-602 (1995)).

25 **[0004]** Actualmente, la familia de enzimas de la PI 3-quinasa se divide en tres clases según sus especificidades de sustrato. Las PI3Ks 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 el PI y el fosfatidilinositol-4-fosfato, mientras que las PI3K de Clase III solo pueden fosforilar el PI.

30 **[0005]** La purificación inicial y clonación molecular de la PI 3-quinasa reveló que era un heterodímero consistente 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 PI3Ks Clase I distintas, designadas PI3K  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ , consistiendo cada una de una subunidad de 110 kDa y una subunidad regulatoria. Más específicamente, tres de las subunidades catalíticas, es decir, p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , and p110 $\gamma$ , interactúan cada una con la misma subunidad regulatoria, es decir, p85, mientras que la p110 $\gamma$  interactúa con una subunidad regulatoria p101 distinta. Como se describe a continuación, los patrones de expresión de cada una de estas PI3Ks en las células y tejidos humanos también son distintos. Aunque se ha acumulado una enorme información sobre las funciones celulares de cada una de estas PI3Ks en general, se desconocen los papeles que tiene cada una de las isoformas.

35 **[0006]** Se ha descrito la clonación de la p110 $\alpha$  bovina. Esta proteína se identificó como relacionada con la proteína de *Sarcomyces cerevisiae*: Vps34p, una proteína involucrada en el procesamiento de la proteína vacuolares. También se ha demostrado que el producto p110 $\alpha$  recombinante está asociado con p85 $\alpha$ , para producir una actividad de PI3K en células COS-1 trasfectadas. Ver Hiles et al., Cell, 70, 419-29 (1992).

40 **[0007]** La clonación de una segunda isoforma p110 humana, designada p110 $\beta$ , se describe en Hu et al., Mol. Cell. Biol., 13:7677-88 (1993). Se dice que esta isoforma se asocia con p85 en las células, y se expresa extensamente, ya que se ha encontrado RNA de p110 $\beta$  en numerosos tejidos humanos y murinos, así como en células endoteliales de vena umbilical humana, linfocitos T leucémicos humanos Jurkat, células renales embrionarias humanas 293, fibroblastos 3T3 murinos, células HeLa y células NBT2 de carcinoma de vejiga de rata. Esta amplia expresión sugiere que la isoforma de la p110 $\beta$  es ampliamente importante en las vías de señalización.

45 **[0008]** La identificación de la isoforma p110 $\delta$  de la PI 3-quinasa se describe en Chantry et al., J. Biol. Chem., 272:19236-41 (1997). Se observa que la isoforma humana de p110 $\delta$  se expresa de forma limitada al tejido. Se expresa a niveles elevados en linfocitos y tejidos linfoides, sugiriendo que la proteína podría participar en la señalización mediada por la PI 3-quinasa en el sistema inmune. Detalles concernientes a la isoforma de la p110 $\delta$  también pueden encontrarse en U.S. Patent Nos. 5,858,753; 5,822,910; y 5,985,589. Ver también Vanhaesebroeck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4330-5 (1997), y International Publication No WO 97/46688.

[0009] En cada uno de los subtipos de la PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\delta$ , la subunidad p85 actúa para localizar la PI 3-quinasa en la membrana plasmática por la interacción de su dominio SH2 con los residuos tirosín fosforilados (presentes en un contexto de secuencia apropiados) en las proteínas albo (Rameh et al., Cell, 83:821-30 (1995)). Se han identificado dos isoformas de p85, p85 $\alpha$ , la cual se expresa extensamente, y p85 $\beta$ , la cual se encuentra principalmente en el cerebro y tejidos linfoides (Volinia et al., Oncogene, 7:789-93 (1992)). Parece requerirse la asociación de la subunidad p85 con las subunidades catalíticas p110 $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\delta$  de la PI 3-quinasa para la actividad catalítica y estabilidad de estas enzimas. Además, la unión de las proteínas Ras también active la actividad de la PI 3-quinasa.

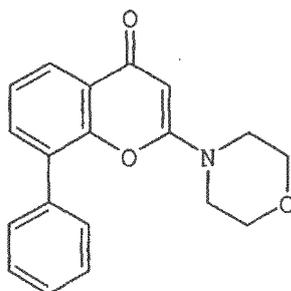
[0010] La clonación de p110 $\gamma$  reveló aún mayor complejidad dentro de la familia de enzimas de la PI3K (Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)). La isoforma p110 $\gamma$  está estrechamente relacionada con p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  (45-48% de identidad en el dominio catalítico), pero como se nota no hace uso de p85 como subunidad alba. A su vez, p110 $\gamma$  contiene un dominio adicional denominado "dominio de homología pleckstrin" cerca de su extremo amino. Este dominio permite la interacción de p110 $\gamma$  con las subunidades  $\beta$  de las proteínas G heterotriméricas y esta interacción parece regular su actividad.

[0011] La subunidad regulatoria p101 para PI3Kgamma se clonó originalmente en el cerdo, y el ortólogo humano se identificó posteriormente (Krugmann et al., J. Biol. Chem., 274:17152-8 (1999)). La interacción entre la región N-terminal de p101 con la región N-terminal de p110 $\gamma$  parece ser crítica para la actividad de PI3K $\gamma$  a través de G $\beta$  mencionada antes.

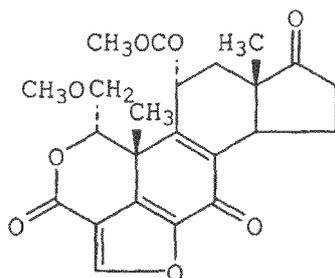
[0012] Se describe un polipéptido PI3K constitutivamente activo en International Publication No. WO 96/25488. Esta publicación muestra la preparación de una proteína de fusión quimérica en la cual un fragmento de 102 residuos de p85 conocido como la región inter-SH2 (iSH2) se fusiona a través de una región de enlace al terminal N de la p110 murina. El dominio p85 iSH2 aparentemente puede activar la actividad PI3K de una forma comparable a la p85 intacta (Klippel et al., Mol. Cell. Biol., 14:2675-85 (1994)). [0013] Así, las PI 3-quinasas pueden definirse por su identidad de aminoácidos o por su actividad. Los miembros adicionales de esta familia de genes en crecimiento incluyen quinasas de lípidos y proteínas más distantes relacionadas incluyendo Vps34 TOR1, TOR2 de *Saccharomyces cerevisiae* (y sus homólogos en mamíferos tales como FRAP y mTOR), el producto del gen de la ataxia-telangiectasis (ATR) y la subunidad catalítica de la quinasa de proteína dependiente del DNA (DNA-PK). Ver generalmente Hunter, Cell, 83:1-4 (1995).

[0014] La PI 3-quinasa también parece participar en algunos aspectos de la activación leucocitaria. Se ha demostrado que una actividad PI 3-quinasa asociada con p85 se asocia físicamente con el dominio citoplásmico de la CD28, la cual es una importante molécula coestimuladora para la activación de los linfocitos T en 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 disminuye el umbral para la activación por el antígeno y aumenta la magnitud y duración de la respuesta proliferativa. Estos efectos se relacionan con aumentos en la transcripción de algunos genes incluyendo el de la interleucina-2 (IL2=, un importante factor de crecimiento de linfocitos T (Fraser et al., Science, 251:313-16 (1991)). La mutación de CD28 de forma que ya no pueda interactuar con la PI 3-quinasa conduce a un fallo para iniciar la producción de IL2 sugiriendo un papel crítico para la PI 3-quinasa en la activación del linfocito T.

[0015] Inhibidores específicos contra miembros individuales de una familia de enzimas proporcionan herramientas valiosas para deescifrar funciones de cada enzima. Dos compuestos, LY294002 y wortmannina, se han usado ampliamente como inhibidores de la PI 3-quinasa. Sin embargo, estos compuestos son inhibidores inespecíficos de la PI3K, ya que no distinguen entre los cuatro miembros de las PI 3-quinasa de Clase I. Por ejemplo, los valores de IC50 de wortmannina contra cada una de las PI 3-quinasas de Clase I están en el rango de 1-10 nM. Similarmente, los valores de IC50 para LY294002 contra cada una de estas PI 3-quinasa es de 1  $\mu$ M (Fruman et al., Ann. Rev. Biochem., 67:481-507 (1998)). De aquí que la utilidad de estos compuestos para estudiar el papel de las PI 3-quinasas individuales de Clase I es limitada.



LY294002



wortmannin

15 **[0016]** Según estudios usando wortmannina, existe evidencia que la función de la PI 3-quinasa también se requiere para algunos aspectos de señalización de leucocitos a través de receptores acoplados a la proteína G (Thelen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4960-64 (1994)). Asimismo, se ha demostrado que wortmannin y LY294002 bloquean la migración de los neutrófilos y la liberación de superóxido. Sin embargo, debido a que estos compuestos no distinguen entre las varias isoformas de la PI3K, aún no está claro qué isoforma o isoformas particulares de la PI3K están implicadas en estos fenómenos.

20 **[0017]** En vista de las consideraciones anteriores, está claro que actualmente nuestro conocimiento es carente con respecto a los rasgos estructurales y funcionales de las enzimas PI 3-quinasas, incluyendo su localización subcelular, estados de activación, afinidades por sustrato, etc. Asimismo, aún están por aclararse las funciones que estas enzimas realizan en los tejidos normales y alterados. En particular, la función de la PI3K $\delta$  en los leucocitos no se ha caracterizado previamente, y el conocimiento concerniente a su función en la fisiología humana sigue siendo limitado. La coexpresión en estos tejidos de otras isoformas de la PI3K hasta ahora ha confundido los esfuerzos por segregar las actividades de cada enzima. Asimismo, la separación de las actividades de las isoenzimas de la PI3K puede no ser posible sin la identificación de los inhibidores que demuestran características selectivas de inhibición. En realidad, los aplicantes actualmente no están concientes que se han demostrado estos inhibidores selectivos, o mejor aún, específicos de las isoenzimas de la PI3K.

30 **[0018]** Así, existe la necesidad de una mayor caracterización estructural del polipéptido PI3K $\delta$ . También existe la necesidad de una caracterización funcional de la PI3K $\delta$ . Asimismo, comprender la PI3K $\delta$  requiere una mayor elaboración de las interacciones estructurales de p110 $\delta$ , tanto con su subunidad regulatoria como con otras proteínas en la célula. También siguen siendo necesarios inhibidores selectivos o específicos de las isoformas de la PI3K, de forma de poder caracterizar mejor las funciones de cada isoforma. En particular, los inhibidores selectivos o específicos de la PI3K $\delta$  son deseables para explorar el papel de esta isoforma y para el desarrollo de fármacos para modular la actividad de la isoforma.

#### 40 RESUMEN DE LA INVENCION

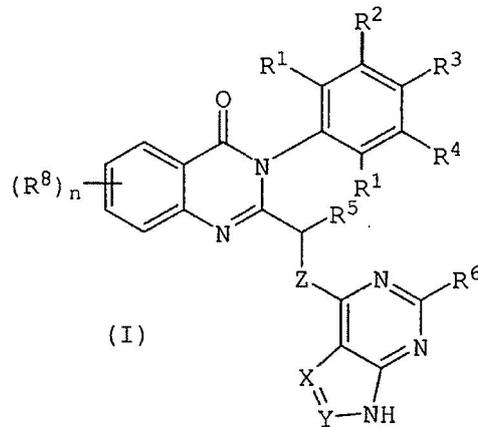
45 **[0019]** Un aspecto de la presente invención es proporcionar compuestos capaces de inhibir la actividad biológica de la PI3K $\delta$  humana. Otro aspecto de la presente invención es proporcionar compuestos que inhiban la PI3K $\delta$  selectivamente comparada con otras isoformas de la PI3K. Otro aspecto más de la declaración es proporcionar un método para modular selectivamente la actividad de la PI3K $\delta$  humana, y promover así el tratamiento médico de las enfermedades mediadas por la disfunción de la PI3K $\delta$ . Otro aspecto adicional de la declaración es proporcionar un método de caracterizar la función de la PI3K $\delta$  humana.

50 **[0020]** Otro aspecto de la presente declaración es proporcionar un método de alterar la función de los leucocitos que comprende contactar a los leucocitos con un compuesto que inhibe selectivamente la actividad de la fosfatidilinositol-3quinasa delta (PI3K $\delta$ ) en los leucocitos. Los leucocitos pueden comprender células seleccionadas del grupo consistente en neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T y basófilos.

55 **[0021]** Por ejemplo, en los casos donde los leucocitos comprenden a los neutrófilos, el método comprende alterar al menos una función de los neutrófilos seleccionada a partir del grupo consistente en la liberación de superóxido estimulado, exocitosis estimulada y migración quimiotáctica. Preferiblemente, el método no altera sustancialmente la fagocitosis bacteriana ni la muerte bacteriana por los neutrófilos. En los casos donde los leucocitos comprenden a los linfocitos B, el método comprende alterar la proliferación de los linfocitos B o producción de anticuerpos por los linfocitos B. En los casos donde los leucocitos comprenden a los linfocitos T, el método comprende alterar la proliferación de los linfocitos T. En los casos donde los leucocitos comprenden a los basófilos, el método comprende alterar la liberación de histamina por los basófilos.

65 **[0022]** Es preferible que el inhibidor de la PI3K $\delta$  sea selectivo. Es preferible que el inhibidor de la PI3K $\delta$  sea al menos 100 veces selectivo para la inhibición de p110 $\delta$  en relación con p110 $\alpha$ , al menos unas 40 veces selectivo en relación con p110 $\beta$ , y al menos unas 10 veces selectivo en relación con p110 $\gamma$  en un ensayo bioquímico.

**[0023]** Los compuestos de la presente invención son como se define en las declaraciones. También se muestran los compuestos que son capaces de inhibir la actividad de la PI3Kδ y tienen una fórmula estructural (I):



donde

X e Y, independientemente, son N o CR<sup>C</sup>; Z es N-R<sup>7</sup> u O;

R<sup>1</sup> son los mismos y son hidrógeno, halo o C<sub>1-3</sub>alquil;

R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, independientemente, son hidrógeno, halo o C<sub>1-3</sub>alquil;

R<sup>4</sup> es hidrógeno, halo, OR<sup>a</sup>, CN, C<sub>2-6</sub>alquil, C(=O)R<sup>a</sup>, C(=O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, C<sub>3-6</sub>heterocicloalquil, C<sub>1-3</sub>alquilenC<sub>3-6</sub>heterocicloalquil, OC<sub>1-3</sub>alquilenOR<sup>a</sup>, OC<sub>1-3</sub>alquilenNR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, OC<sub>1-3</sub>alquilenC<sub>3-6</sub>cicloalquil, OC<sub>3-6</sub>heterocicloalquil, OC<sub>1-3</sub>alquilenC≡CH o OC<sub>1-3</sub>alquilenC(=O)NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

R<sup>5</sup> es C<sub>1-3</sub>alquil, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, fenil, CH<sub>2</sub>C≡CH, C<sub>1-3</sub>alquilenOR<sup>e</sup>, C<sub>1-4</sub>alquilenNR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, o C<sub>1-4</sub>alquilenNHC(=O)OR<sup>a</sup>, R<sup>6</sup> s hidrógeno, halo, o NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>;

R<sup>7</sup> es hidrógeno o R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> forman junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos un anillo saturado de 5 o 6 miembros;

R<sup>8</sup> es C<sub>1-3</sub>alquil, halo, CF<sub>3</sub>, o CH<sub>2</sub>C<sub>3-6</sub>heterocicloalquil;

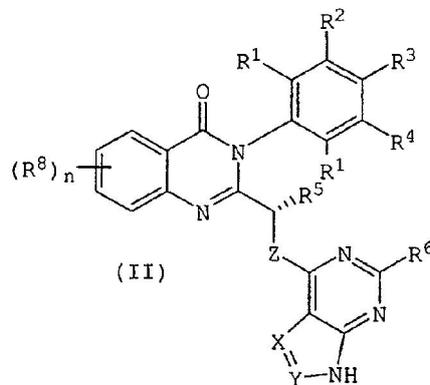
n es 0, 1 o 2;

R<sup>a</sup> es hidrógeno, C<sub>1-4</sub>alquil, o CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>b</sup> es hidrógeno o C<sub>1-3</sub>alquil; y

R<sup>c</sup> es hidrógeno, C<sub>1-3</sub>alquil, o halo,

cuando los grupos R<sup>1</sup> son diferentes de hidrógeno, R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> son los mismos: o una sal, prodroga o solvente farmacéuticamente aceptables (p.ej., hidrato).

**[0024]** También se muestran los compuestos de fórmula estructural (II) y capaces de inhibir la actividad de la PI3Kδ :



donde X, Y, Z, R<sup>1</sup> a R<sup>8</sup>, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y n son como se define antes, o una sal, prodroga o solvente farmacéuticamente aceptables (p.ej., hidrato).

**[0025]** Otro aspecto de la presente declaración es proporcionar un método de tratar una condición médica mediada por neutrófilos que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de

un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II). Las condiciones médicas ilustrativas que pueden tratarse de acuerdo con el método incluyen esas condiciones caracterizadas por una función neutrofílica indeseable seleccionada a partir del grupo consistente en la liberación estimulada de superóxido, exocitosis estimulada y migración quimiotáctica. Preferiblemente, de acuerdo con el método, la actividad fagocítica o muerte bacteriana por los neutrófilos sustancialmente no se inhibe.

[0026] Otro aspecto adicional de la presente declaración es proporcionar un método de alterar una función de los osteoclastos que comprende contactar a los osteoclastos con un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II).

[0027] Otro aspecto de la presente declaración es proporcionar un método de mejorar un trastorno de la resorción ósea en un mamífero que lo necesite comprendiendo administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II). Un trastorno preferido de resorción ósea idóneo para el tratamiento de acuerdo con el método es la osteoporosis.

[0028] Otro aspecto adicional de la presente declaración es proporcionar un método de inhibir el crecimiento o proliferación de las células cancerosas de origen hematopoyético contactando a las células cancerosas con un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II). El método puede ser ventajoso inhibiendo el crecimiento o proliferación de las neoplasias seleccionadas a partir del grupo consistente en linfomas, mielomas múltiples y leucemias.

[0029] Otro aspecto de la presente declaración es proporcionar un método de inhibir la actividad quinasa de un polipéptido PI3K $\delta$  comprendiendo contactar el polipéptido PI3K $\delta$  con un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II).

[0030] Otro aspecto adicional de la presente declaración es proporcionar un método de alterar la función leucocitaria contactando a los leucocitos con un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II).

[0031] Aquí se muestran los compuestos de fórmulas estructurales (I) o (II) que inhiben la actividad PI3K $\delta$  en ensayos bioquímicos y celulares, y exhiben un beneficio terapéutico tratando las condiciones médicas donde la actividad PI3K $\delta$  es excesiva o indeseable.

[0032] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de fórmulas estructurales (I) o (II), y el uso de las composiciones en un tratamiento terapéutico, donde la inhibición del polipéptido PI3K $\delta$ , *in vivo* o *ex vivo*, proporciona un beneficio terapéutico o es de interés de investigación o diagnóstico.

[0033] Otro aspecto de la presente declaración es proporcionar un artículo de preparación para el uso farmacéutico humano que comprende:

(a) una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II); y,

(b) un contenedor, comprendiendo opcionalmente además un inserto en el paquete en tanto la composición sea útil en el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por la actividad de la PI3K $\delta$ .

[0034] Otro aspecto de la presente invención es proporcionar:

(a) una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II); y,

(b) un contenedor, comprendiendo opcionalmente además un inserto en el paquete en tanto la composición sea útil en el tratamiento de un trastorno de la resorción ósea o un cáncer de origen hematopoyético.

[0035] Éstos y otros aspectos y ventajas de la presente invención estarán claros a partir de la siguiente descripción detallada de las funciones preferidas, las cuales se proporcionan para aumentar la comprensión de la invención sin limitar el alcance de la invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FUNCIONES PREFERIDAS

[0036] La presente invención proporciona compuestos que inhiben selectivamente la actividad de la PI3K $\delta$ . La presente declaración proporciona métodos para usar los compuestos para inhibir la actividad de la PI3K $\delta$ , incluyendo métodos para modular selectivamente la actividad de la isoforma de la PI3K $\delta$  en las células, especialmente leucocitos, osteoclastos y células cancerosas. Los métodos incluyen aplicaciones *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo*.

[0037] De particular beneficio son los métodos para usar los compuestos de la invención para modular selectivamente la actividad de la PI3K $\delta$  en situaciones clínicas para mejorar enfermedades o trastornos mediados por

la actividad de la PI3K $\delta$ . Así, el tratamiento de las enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad excesiva o inapropiada de la PI3K $\delta$  puede hacerse a través de la administración de moduladores selectivos de la PI3K $\delta$ .

5 **[0038]** Asimismo, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$  de fórmulas estructurales (I) o (II). También se suministran artículos de preparación que comprenden un compuesto inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$  (o una composición farmacéutica que comprende el compuesto) e instrucciones para usar el compuesto. Otros métodos de la invención incluyen permitir la caracterización del papel fisiológico de la isozima.

10 **[0039]** Los métodos descritos aquí se benefician del uso de compuestos que inhiben selectivamente, e inhiben preferiblemente de forma específica, la actividad de la PI3K $\delta$  en las células, incluyendo células *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*. Las células tratadas por los métodos expuestos aquí incluyen las que expresan la PI3K $\delta$  endógena, donde endógeno indica que las células que expresan la introducción recombinante ausente de PI3K $\delta$  en las células de uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido PI3K $\delta$  o un fragmento biológicamente activo. Los métodos mostrados aquí también incluyen el uso de células que expresan PI3K $\delta$  exógeno, donde se ha introducido uno o más polinucleótidos que codifican PI3K $\delta$  o un fragmento biológicamente activo en la célula usando procedimientos recombinantes.

20 **[0040]** Las células pueden ser *in vivo*, es decir, en un sujeto vivo, p.ej., un mamífero, incluyendo humanos, donde un inhibidor de la PI3K $\delta$  puede usarse terapéuticamente para inhibir la actividad de la PI3K $\delta$  en el sujeto. Alternativamente, las células pueden aislarse como células discretas o en un tejido, para métodos *ex vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vitro* incluidos por la invención pueden comprender el paso de contactar una enzima PI3K $\delta$  o un fragmento biológicamente activo con un compuesto inhibidor de la invención. La enzima PI3K $\delta$  puede incluir una enzima purificada y aislada, donde la enzima es aislada a partir de una fuente natural (p.ej., células o tejidos que normalmente expresan una modificación ausente del polipéptido de PI3K $\delta$  por tecnología recombinante) o aislado a partir de células modificadas por tecnologías recombinantes para expresar la enzima exógena.

30 **[0041]** Los compuestos de la invención inhiben potentemente p110 $\delta$ . La potencia se expresa como la concentración de un compuesto requerida para lograr cierto resultado. Mientras mayor es la potencia, se requiere menos compuesto para realizar su función pretendida. La potencia *in vitro* se expresa en términos de los valores IC<sub>50</sub> medidos usando un ensayo dosis-respuesta. Los valores IC<sub>50</sub> pueden medirse contactando un sistema de ensayo sensible con un compuesto de interés sobre un rango de concentraciones, incluyendo concentraciones a las cuales no se observa efecto o se observa un efecto mínimo, a través de concentraciones más altas a las cuales se observa un efecto parcial, a concentraciones saturantes a las cuales se observa un efecto máximo. Teóricamente, tales ensayos del efecto dosis-respuesta de los compuestos inhibidores pueden describirse como una curva sigmoide que expresa un grado de inhibición como una función de la concentración cuando se grafica sobre una escala logarítmica. La curva también pasa teóricamente a través de un punto al cual la concentración es suficiente para reducir la actividad de la enzima p110 $\delta$  a un nivel que es 50% de la diferencia entre la actividad mínima y máxima de la enzima observada en el ensayo. Esta concentración se define como la Concentración Inhibitoria al 50% de inhibición o valor IC<sub>50</sub>.

45 **[0042]** Los valores IC<sub>50</sub> pueden determinarse usando técnicas de ensayo bioquímico convencional (acelular) o técnicas de ensayo celular conocidas por los expertos en la materia. Un ejemplo de tal ensayo se proporciona en los ejemplos a continuación. Preferiblemente, los valores IC<sub>50</sub> se obtienen realizando el ensayo relevante al menos dos veces, con el valor IC<sub>50</sub> expresado como el promedio (media aritmética, o "media") de los valores individuales obtenidos. Más preferiblemente, el ensayo se repite de 3 a 10 (o más) veces, con el valor IC<sub>50</sub> expresado como la media de los valores obtenidos. Aún más preferiblemente, el ensayo se realiza un número de veces suficiente para generar un valor IC<sub>50</sub> medio estadísticamente confiable, usando métodos estadísticos conocidos por los expertos en la materia.

55 **[0043]** Los compuestos de fórmulas (I) y (II) exhiben valores IC<sub>50</sub> inesperadamente bajos en relación con PI3K $\delta$ , correspondiendo a una potencia inesperadamente alta *in vitro*. En varios contextos, los compuestos de las fórmulas (I) y (II), cuando se evalúan como se describen en Ejemplo 14 más adelante, exhiben valores de IC<sub>50</sub> de PI3K $\delta$  menores de 250 nM, menores de 200 nM, menores de 150 nM, menores de 125 nM, menores de 100 nM, menores de 75 nM, menores de 50 nM, menores de 25 nM, menores de 10 nM y en otros menores de 5 nM. En otros contextos, los compuestos de la invención exhiben valores IC<sub>50</sub> de 0.1 nM a 5 nM.

60 **[0044]** Los compuestos de fórmulas (I) y (II) son inhibidores selectivos de la PI3K $\delta$ . El término "inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$ " como se usa aquí se refiere a un compuesto que inhibe la isozima PI3K $\delta$  más efectivamente que otras isozimas de la familia PI3K. Un compuesto "inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$ " se comprende que es más selectivo de la PI3K $\delta$  que los compuestos convencional y genéricamente designados inhibidores de la PI3K, p.ej., wortmannina o LY294002. Concomitantemente, wortmannina o LY294002 se consideran "inhibidores no selectivos de la PI3K."

Asimismo, los compuestos de la presente invención regulan selectivamente de forma negativa la expresión o actividad de la PI3K $\delta$  y poseen propiedades farmacológicas aceptables para su uso en los métodos terapéuticos de la invención.

5 **[0045]** Por consiguiente, un inhibidor selectivo alternativamente puede comprenderse que se refiere al menos a un compuesto que exhibe una concentración 50% inhibitoria (IC<sub>50</sub>) con respecto a la PI3K $\delta$  que es al menos unas 50 veces, al menos unas 100 veces, al menos unas 150 veces, al menos unas 200 veces, al menos unas 250 veces, al menos unas 300 veces, al menos unas 350 veces, al menos unas 400 veces, al menos unas 500 veces, al menos unas 600 veces, al menos unas 700 veces, al menos unas 800 veces, al menos unas 900 veces o al menos unas 1000 veces menor que el valor IC<sub>50</sub> para la PI3K $\alpha$ . En contextos alternativos, el término inhibidor selectivo puede comprenderse que se refiere al menos a un compuesto que exhibe un IC<sub>50</sub> con respecto a la PI3K $\delta$  que es al menos unas 5 veces, al menos unas 10 veces, al menos unas 20 veces, al menos unas 30 veces, al menos unas 40 veces, al menos unas 50 veces, al menos unas 60 veces, al menos unas 70 veces, al menos unas 80 veces, al menos unas 90 veces o al menos unas 100 veces menor que el valor IC<sub>50</sub> para la PI3K $\gamma$ . En otros contextos, el término inhibidor selectivo puede comprenderse que se refiere al menos a un compuesto que exhibe un IC<sub>50</sub> con respecto a la PI3K $\delta$  que es al menos unas 5 veces, al menos unas 10 veces, al menos unas 20 veces, al menos unas 30 veces, al menos unas 40 veces, al menos unas 50 veces, al menos unas 75 veces, al menos unas 100 veces, al menos unas 125 veces, al menos unas 150 veces, al menos unas 175 veces, al menos unas 200 veces, al menos unas 250 veces, al menos unas 300 veces o al menos unas 350 veces menor que el valor IC<sub>50</sub> para la PI3K $\beta$ . Los inhibidores selectivos se administran en una cantidad tal que inhiben de forma selectiva la PI3K $\delta$ , como se describe antes.

**[0046]** Por tanto, los compuestos más preferidos de la presente invención tienen un valor IC<sub>50</sub> bajo vs la PI3K $\delta$  (es decir, el compuesto es un inhibidor potente), y son selectivos con respecto a inhibir la PI3K $\delta$  en relación al menos con una de PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , y PI3K $\gamma$ .

25 **[0047]** “*In vivo*” significa dentro de un ser vivo, como dentro de un animal o humano. En este contexto, los agentes pueden usarse terapéuticamente *in vivo* para retardar o eliminar la proliferación de células que se replican de forma aberrante. Los agentes también pueden usarse *in vivo* como profiláctico para prevenir la proliferación celular aberrante o la manifestación de los síntomas asociados.

30 **[0048]** “*Ex vivo*” significa fuera de un ser vivo. Ejemplos de poblaciones celulares *ex vivo* incluyen cultivos celulares y muestras biológicas tales como muestras de fluido o tejido de humanos o animales. Tales muestras pueden obtenerse por métodos conocidos por los expertos. Muestras biológicas ilustrativas de fluidos incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva. Muestras de tejido ilustrativas incluyen tumores y biopsias. En este contexto, los compuestos presentes pueden estar en numerosas aplicaciones, terapéuticas y experimentales.

35 **[0049]** El término “contenedor” significa cualquier receptáculo y cierre idóneo para almacenar, enviar, dispensar y/o manipular un producto farmacéutico.

40 **[0050]** El término “inserto del paquete” significa información que acompaña al producto que proporciona una descripción de cómo administrar el producto, junto con los datos de seguridad y eficacia requeridos para permitir al médico, farmacéutico o paciente tomar una decisión informada con respecto al uso del producto. Para un producto farmacéutico aprobado para su uso en humanos o animales, la autoridad aprobatoria puede especificar el contenido del inserto del paquete, y tal inserto puede denominarse informalmente “etiqueta” para el producto.

45 **[0051]** En un contexto, la presente declaración proporciona un método de inhibir la función de los leucocitos. Más particularmente, la presente declaración proporciona métodos de inhibir o suprimir las funciones de los neutrófilos y linfocitos T y B. Con respecto a los neutrófilos, inesperadamente se ha encontrado que la inhibición de la actividad de la PI3K $\delta$  inhibe las funciones de los neutrófilos. Por ejemplo, se ha observado que los compuestos de la presente declaración inducen la inhibición de las funciones clásicas de los neutrófilos, como la producción estimulada de superóxido, la exocitosis estimulada y la migración quimiotáctica. Sin embargo, se ha observado que un método de la presente declaración permite la supresión de ciertas funciones de los neutrófilos, aunque sin afectar sustancialmente otras funciones de estas células. Por ejemplo, se ha observado que la fagocitosis de bacterias por los neutrófilos no es sustancialmente inhibida por los compuestos inhibidores selectivos de la PI3K $\delta$  de la presente declaración.

50 **[0052]** Así, la presente declaración incluye métodos de inhibición de las funciones de los neutrófilos, sin inhibir sustancialmente la fagocitosis de las bacterias. Las funciones de los neutrófilos idóneas para la inhibición de acuerdo con el presente método incluyen cualquier función mediada por la actividad o expresión de la PI3K $\delta$ . Tales funciones incluyen, sin limitación, la liberación estimulada de superóxido, exocitosis o degranulación estimulada, migración quimiotáctica, adherencia al endotelio vascular (p.ej., enrolamiento de los neutrófilos, inducción de la actividad neutrofílica y/o acoplamiento de los neutrófilos al endotelio), diapédesis tras mural o emigración a través del endotelio a los tejidos periféricos. En general, estas funciones pueden denominarse colectivamente, “funciones inflamatorias” ya que se relacionan con la respuesta del neutrófilo a la inflamación. Las funciones inflamatorias de los neutrófilos pueden distinguirse de las funciones de eliminación bacteriana exhibidas por estas células, p.ej.,

fagocitosis y eliminación de bacterias. Por consiguiente, la presente declaración incluye métodos de tratar estados de enfermedad en los cuales una o más de las funciones inflamatorias de los neutrófilos son anormales o indeseables.

5 **[0053]** Los compuestos de la presente invención pueden usarse para inhibir una respuesta inmune endógena estimulada al menos por un factor endógeno sin inhibir sustancialmente una respuesta inmune exógena estimulada al menos por un factor exógeno como se declara en US 2005/0043239 A1.

10 **[0054]** Los compuestos de la presente invención también pueden usarse para inhibir una respuesta inmune endógena estimulada al menos por un factor endógeno sin inhibir sustancialmente la capacidad de respuesta inmune, como se declara en US 2005/0043239 A1. Por consiguiente, los compuestos de la invención ventajosamente permiten el tratamiento de las condiciones asociadas con una respuesta inmune endógena indeseable estimulada al menos por un factor endógeno sin comprometer la capacidad para luchar contra la infección.

15 **[0055]** Los compuestos de la presente invención también pueden usarse para inhibir la acumulación de los leucocitos como se declara en US 2005/0054614 A1. Los compuestos también pueden usarse para inhibir el rodamiento de los leucocitos a las células endoteliales e inhibir la trasmigración de los leucocitos en el tejido inflamado, como se declara en US 2005/0043239 A1. Por consiguiente, los compuestos de la invención permiten ventajosamente el tratamiento de los individuos que tienen una condición inflamatoria donde se encuentra que los leucocitos se acumulan en el sitio del daño o del tejido inflamado.

20 **[0056]** Se ha establecido que la PI3K $\delta$  participa en la proliferación estimulada de los linfocitos, incluyendo linfocitos B y T. Asimismo, la PI3K $\delta$  parece participar en la secreción estimulada de anticuerpos por los linfocitos B. Los compuestos inhibitorios selectivos de la PI3K $\delta$  de la presente invención se han empleado para establecer que estos fenómenos pueden ser abolidos por la inhibición de la PI3K $\delta$ . Así, la presente declaración incluye métodos para usar compuestos de fórmulas estructurales (I) o (II) para inhibir la proliferación de linfocitos, o para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Otros métodos mostrados por la presente declaración incluyen métodos de tratar estados de enfermedad en los cuales una o más de estas funciones linfocitarias son anormales o indeseables.

25 **[0057]** Los métodos de esta declaración pueden practicarse usando compuesto de fórmulas estructurales (I) o (II). Los métodos pueden practicarse usando una mezcla racémica de los compuestos o un enantiómero específico. En contextos preferidos, se usa el S-enantiómero de los compuestos en los presentes métodos.

30 **[0058]** Los métodos pueden practicarse usando, por ejemplo, los siguientes compuestos

35 **[0059]** 5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(2,6-difluoro-fenil)-2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 5-metil-3-fenil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-propil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[2-benziloxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[2-benziloxi-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[2-benziloxi-1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(4-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(4-fluoro-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(4-fluoro-fenil)-2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(4-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 5-methyl-3-phenyl-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 3-(3-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-fluoro-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(3-fluorofenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-il)-pirrolidin-2-il]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[2-hidroxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 5-metil-3-fenil-2-[fenil-(9H-purin-6-ilamino)-metil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-fenil-metil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-fenil-metil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 5-metil-3-fenil-2-[fenil-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-metil]-3H-quinazolin-4-ona; 5-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-fluoro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-cloro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; [5-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-5-(9H-purin-6-ilamino)-pentil]-carbámico ácido benzil éster; [5-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-5-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-pentil]-carbámico ácido benzil éster; [4-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-4-(9H-purin-6-ilamino)-butil]-carbámico ácido benzil éster; [4-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-4-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-butil]-carbámico ácido benzil éster; 3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 2-[5-amino-1-(9H-purin-6-ilamino)-pentil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[5-amino-1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-pentil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona; 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(2,6-dimetil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona; 3-(2,6-dimetil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona; 5-morfolin-



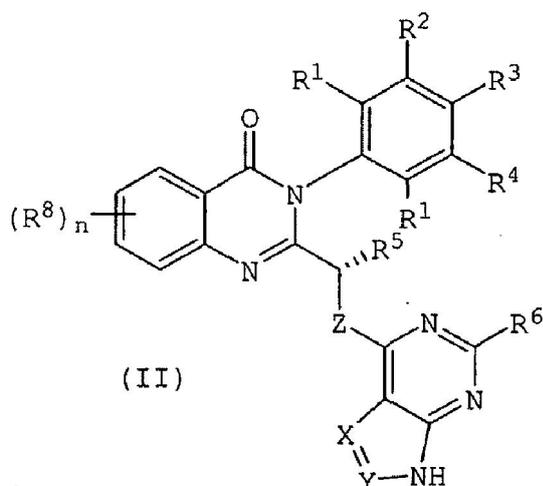


5

10

15

20



25

donde X, Y, Z, R<sup>1</sup> hasta R<sup>8</sup>, R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup> y n son como se define antes.

**[0063]** Exhibiendo una potencia elevada en relación con otros compuestos son los compuestos donde

**[0064]** R<sup>8</sup> es C<sub>1-3</sub>alquil, F, Cl, o CF<sub>3</sub>. Alternativamente, n es 0 (de forma que no hay sustituyente en R<sup>8</sup>).

30

**[0065]** Exhibiendo tal potencia elevada, X e Y, independientemente, son N o CH. Exhibiendo una potencia aún más elevada, X es N e Y es CH. Alternativamente, X e Y también pueden ser CH. Exhibiendo aún más potencia, R<sup>6</sup> es hidrógeno, halo o NH<sub>2</sub>.

35

**[0066]** Inesperadamente, la potencia contra la PI3Kδ se conserva cuando R<sup>1</sup> es la misma. En las fórmulas estructurales (I) y (II), R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> pueden diferir en tanto que R<sup>1</sup> es H. Cuando R<sup>1</sup> es H, inesperadamente se permite una rotación libre alrededor del enlace que conecta el anillo fenilo que sustituye el anillo quinazolina, y los compuestos ventajosamente no exhiben atropisomerismo (es decir, se evita la formación de diastereómero múltiple). Alternativamente, R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> pueden ser el mismo de forma que los compuestos ventajosamente no exhiben atropisomerismo.

40

**[0067]** Como se usa aquí, el término "alquil" se define como grupos hidrocarbano de cadena simple y ramificada que contienen el número indicado de átomos de carbono, p.ej., metil, etil y cadenas simples y ramificadas de propil y butil.

45

**[0068]** Los términos "C<sub>1-3</sub>alquilen" y "C<sub>1</sub>galquilen" se definen como grupos hidrocarbano que contienen el número indicado de átomos de carbono y un hidrógeno menos que el grupo alquil correspondiente.

50

**[0069]** El término "C<sub>2-6</sub>alquiniil" se define como un grupo hidrocarbano que contiene el número indicado de átomos de carbono y un enlace triple carbono-carbono.

55

**[0070]** El término "C<sub>3-6</sub>alquiniil" se define como un grupo hidrocarbano cíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono.

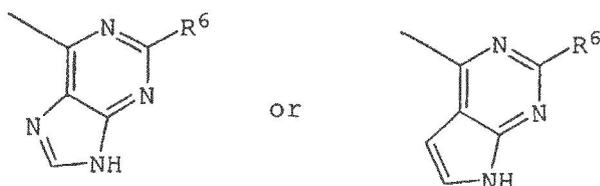
60

**[0071]** El término "C<sub>2-6</sub>heterocicloalquil" se define similarmente como cicloalquil excepto que el anillo contiene uno o dos heteroátomos seleccionados a partir del grupo consistente en O, NR<sup>a</sup> y S.

**[0072]** El término "halo" se define como fluoro, bromo, cloro e iodo.

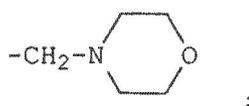
**[0073]** En contextos preferidos, Z es N-R<sup>7</sup> y el sistema de anillo bicíclico que contiene X e Y es

5



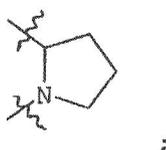
10 **[0074]** En otros contextos preferidos, R<sup>1</sup> es hidrógeno, fluoro, cloro, metil o

15



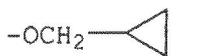
20 R<sup>2</sup> es hidrógeno, metil, cloro, or fluoro; R<sup>3</sup> es hidrógeno o fluoro; R<sup>6</sup> es NH<sub>2</sub>, hidrógeno, o fluoro; R<sup>7</sup> es hidrógeno o R<sup>5</sup> y R<sup>7</sup> se toman juntos para formar

25

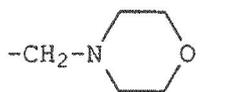


30 R<sup>8</sup> es metil, trifluorometil, cloro, o fluoro; R<sup>4</sup> es hidrógeno, fluoro, cloro, OH, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>C≡CH, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C(=O)CH<sub>3</sub>, C=CH, CN, C(=O)NH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>C(=O)NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

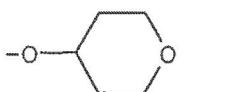
35



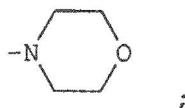
40



45



50



55

y R<sup>5</sup> es metil, etil, propil, fenil, CH<sub>2</sub>OH, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>C≡CH, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=O)OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>, o (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=O)OCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; R<sup>c</sup> es hidrógeno, metil, fluoro, o bromo; y n es 0 o 1.

60 **[0075]** Generalmente se acepta que los sistemas biológicos pueden exhibir respuestas que son muy sensibles a la naturaleza estereoquímica absoluta de los compuestos a los cuales se exponen. Ver, E.J. Ariens, Medicinal Research Reviews, 6:451-66 (1986); E.J. Ariens, Medicinal Research Reviews, 7:367-87 (1987); E.J. Fowler, Handbook of Stereoisomers: Therapeutic Drugs, CRC Press, edited by Donald P. Smith, pp. 35-63 (1989); y S.C. Stinson, Chemical and Engineering News, 75:38-70 (1997).

5 **[0076]** Por tanto, los compuestos de la presente invención incluyen todos los posibles estereoisómeros e isómeros geométricos de los compuestos de fórmula estructural (I), e incluyen no solo los compuestos racémicos, sino también los isómeros ópticamente activos. En contextos preferidos, un compuesto de la presente invención es el S-enantiómero.

10 **[0077]** Cuando un compuesto de fórmula estructural (I) se desea como un solo enantiómero, puede obtenerse por resolución del producto final o por síntesis estereoespecífica de material de inicio isoméricamente puro o el uso de reactivo auxiliar quiral. Por ejemplo, ver Z. Ma et al., Tetrahedron: Asymmetry, 8(6), pages 883-88 (1997). La resolución del producto final, un intermedio o un material de inicio pueden lograrse por cualquier método idóneo conocido por los expertos. Los estereoisómeros específicos, en particular, los S-enantiómeros de los compuestos de la invención, exhiben una excelente capacidad para inhibir la actividad quinasa de la PI3Kδ.

15 Métodos para identificar

Reguladores negativos de la actividad de la PI3Kδ

20 **[0078]** La proteína de la PI3Kδ, así como los fragmentos que poseen actividad biológica, pueden usarse para evaluar compuestos inhibitorios putativos en cualquiera de una variedad de técnicas de evaluación de medicamentos. Un inhibidor de la PI3Kδ es un compuesto que disminuye o abole la capacidad de la PI3Kδ para desempeñar cualquiera de sus funciones biológicas. Un ejemplo de tales compuestos es un agente que disminuye la capacidad de un polipéptido de la PI3Kδ para fosforilar el fosfatidilinositol o dirigirse a estructuras apropiadas dentro de una célula. La selectividad de un compuesto que regula negativamente la actividad de la PI3Kδ puede evaluarse comparando su actividad sobre la PI3Kδ con su actividad sobre otras proteínas. Los inhibidores selectivos incluyen, por ejemplo, anticuerpos y otras proteínas o péptidos que se unen específicamente a un polipéptido de la PI3Kδ, oligonucleótidos que se unen específicamente a polipéptidos de la PI3Kδ y otros compuestos no peptídicos (p.ej., moléculas orgánicas aisladas o sintéticas) que interactúan específicamente con los polipéptidos de la PI3Kδ. Los inhibidores también incluyen compuestos como los descritos antes, pero los cuales interactúan con un compañero de unión específica de los polipéptidos de la PI3Kδ.

30 **[0079]** Actualmente los albos preferidos para el desarrollo de inhibidores selectivos de la PI3Kδ incluyen, por ejemplo:

- 35
- (1) regiones citoplásmicas de polipéptidos de la PI3Kδ que contactan a otras proteínas y/o localizan la PI3Kδ dentro de una célula;
  - (2) regiones de los polipéptidos de la PI3Kδ que se unen a pares específicos de unión;
  - (3) regiones de los polipéptidos de la PI3Kδ que se unen al sustrato;
  - 40 (4) sitios regulatorios alostéricos de los polipéptidos de la PI3Kδ que pueden interactuar o no directamente con el sitio activo sobre la señal regulatoria;
  - (5) regiones de los polipéptidos de la PI3Kδ que median la multimerización.

45 Por ejemplo, un albo para el desarrollo de los moduladores es la identificación regulatoria identificada de p85 con p110δ, la cual puede involucrarse en la activación y/o localización subcelular de la fracción p110δ. Otros moduladores selectivos incluyen los que reconocen secuencias nucleotídicas que codifican regulatorias específicas o PI3Kδ. Los moduladores de la actividad de la PI3Kδ pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de un amplio rango de enfermedades y condiciones fisiológicas en las cuales está involucrada la actividad aberrante de la PI3Kδ.

50 **[0080]** Por consiguiente, se muestran aquí métodos para caracterizar la potencia de un compuesto en estudio como un inhibidor del polipéptido de la PI3Kδ, comprendiendo dicho método los pasos de (a) medir la actividad de un polipéptido de la PI3Kδ en presencia de un compuesto en estudio; (b) comparar la actividad del polipéptido de la PI3Kδ en presencia del compuesto en estudio con la actividad del polipéptido de la PI3Kδ en presencia de una cantidad equivalente de un compuesto de referencia (p.ej., un compuesto que tiene una potencia conocida contra la PI3Kδ), donde una menor actividad del polipéptido de la PI3Kδ en presencia del compuesto en estudio que en presencia de la referencia indica que el compuesto en estudio es un inhibidor más potente que el compuesto de referencia, y una mayor actividad del polipéptido de la PI3Kδ en la presencia del compuesto en estudio que en presencia de la referencia indica que el compuesto en estudio es un inhibidor menos potente que el compuesto de referencia.

60 **[0081]** Se muestran aquí los métodos de caracterizar la potencia de un compuesto en estudio como un inhibidor del polipéptido de la PI3Kδ, comprendiendo los pasos de (a) determinar una cantidad de un compuesto de referencia (p.ej., un compuesto inhibitorio de la PI3Kδ (sic) de la presente invención) que inhibe una actividad de un polipéptido de la PI3Kδ por un porcentaje de referencia de inhibición, por tanto definiendo una cantidad inhibitoria de referencia

65

para el compuesto de referencia; (b) determinando una cantidad de un compuesto en estudio que inhibe una actividad de un polipéptido de la PI3K $\delta$  por un porcentaje de referencia de inhibición, definiendo así una cantidad inhibitoria de referencia para el compuesto en estudio; (c) comparando la cantidad inhibitoria de referencia para el compuesto de referencia, donde una cantidad inhibitoria de referencia menor que para el compuesto de referencia indica que el compuesto en estudio es un inhibidor más potente que el compuesto de referencia, y una cantidad inhibitoria de referencia mayor para el compuesto en estudio que para el compuesto de referencia indica que el compuesto en estudio es un inhibidor menos potente que el compuesto de referencia. En un aspecto, el método usa una cantidad inhibitoria de referencia que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido de la PI3K $\delta$  en 50%, 60%, 70% u 80%. En otro aspecto, el método emplea una cantidad inhibitoria de referencia que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido de la PI3K $\delta$  en 90%, 95% o 99%. Estos métodos comprenden determinar la cantidad inhibitoria de referencia de los compuestos en un ensayo bioquímico *in vitro*, en un ensayo celular *in vitro* o en un ensayo *in vivo*.

**[0082]** Se muestran aquí los métodos de identificar un inhibidor de la actividad de la PI3K $\delta$ , comprendiendo los pasos de (i) medir la actividad de un polipéptido de PI3K $\delta$  en presencia y ausencia de un compuesto en estudio, y (ii) identificar como inhibidor un compuesto en estudio que disminuye la actividad de la PI3K $\delta$  y que compite con un compuesto de la invención para la unión con la PI3K $\delta$ . Asimismo, se muestran métodos para identificar los compuestos que inhiben la actividad de la PI3K $\delta$ , comprendiendo los pasos de (i) contactar un polipéptido de la PI3K $\delta$  con un compuesto de la presente invención en la presencia y ausencia de un compuesto en estudio, y (ii) identificar un compuesto en estudio como un inhibidor de la actividad de la PI3K $\delta$  donde el compuesto compite con un compuesto de la invención por la unión a la PI3K $\delta$ . La declaración por tanto proporciona un método para evaluar los candidatos a inhibidores de la actividad de la PI3K $\delta$  y/o confirmar el modo de acción de tales candidatos a inhibidores. Tales métodos pueden emplearse contra otras isoformas de la PI3K en paralelo para establecer la actividad comparativa del compuesto en estudio a través de las isoformas y/o en relación con un compuesto de la invención.

**[0083]** En estos métodos, el polipéptido de la PI3K $\delta$  puede ser un fragmento de p110 $\delta$  que exhibe actividad quinasa, es decir, un fragmento que comprende el sitio catalítico de p110 $\delta$ . Alternativamente, el polipéptido de la PI3K $\delta$  puede ser un fragmento del dominio de unión p110 $\delta$  de p85 y proporciona un método para identificar a los moduladores alostéricos de la PI3K $\delta$ . Los métodos pueden emplearse en las células que expresan la PI3K $\delta$  o sus subunidades, endógena o exógenamente. Por consiguiente, el polipéptido empleado en tales métodos puede estar libre en solución, fijo a un soporte sólido, modificado a mostrarse sobre una superficie celular o localizarse intracelularmente. La modulación de la actividad o la formación de complejos de unión entre el polipéptido de la PI3K $\delta$  y el agente que se está evaluando puede medirse.

**[0084]** Los polipéptidos de la PI3K humana son idóneos para ensayos de evaluación de alto rendimiento celular (HTS) de acuerdo con métodos conocidos y practicados por los expertos en la materia, incluyendo sistemas de evaluación en melanóforos para investigar las interacciones receptor-ligando, sistemas de evaluación en levadura y sistemas de expresión en células mamíferas. Para una revisión, ver Jayawick-reme et al., Curr Opin Biotechnol, 8:629-34 (1997). Los ensayos de HTS automatizados y miniaturizados también se comprenden como se describe, por ejemplo, en Houston et al., Curr Opin Biotechnol, 8:734-40 (1997).

**[0085]** Tales ensayos HTS se usan para evaluar las bibliotecas de compuestos para identificar compuestos particulares que exhiben una propiedad deseada. Cualquier biblioteca de compuestos puede usarse, incluyendo bibliotecas químicas, bibliotecas de productos naturales y bibliotecas combinatorias que comprenden oligopéptidos al azar o designados, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos. Las bibliotecas químicas pueden contener compuestos conocidos, análogos estructurales ilustrativos de compuestos conocidos o compuestos identificados a partir de la evaluación de productos naturales.

**[0086]** Las bibliotecas de productos naturales son colecciones de materiales aislados de fuentes naturales, microorganismos, animales, plantas u organismos marinos. Los productos naturales se aíslan a partir de sus fuentes por fermentación de los microorganismos seguidos por aislamiento y extracción de los brotes de fermentación o por extracción directa de los microorganismos o tejidos (plantas o animales) mismos. Las bibliotecas de productos naturales incluyen poliquétidos, péptidos no ribosomales y variants (incluyendo variantes no naturales). Para una revisión, ver Cane et al., Science, 282:63-68 (1998).

**[0087]** Las bibliotecas combinatorias están compuestas por grandes números de compuestos relacionados, tales como péptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos como una mezcla. Tales compuestos son relativamente directos para designar y preparar por protocolos de síntesis automatizada tradicional, PCR, clonación o métodos sintéticos registrados. De particular interés son las bibliotecas combinatorias de oligonucleótidos.

**[0088]** Otras bibliotecas de interés incluyen bibliotecas de péptidos, proteínas, peptidomiméticas, colecciones sintéticas multiparalelas, recombinatorias y de polipéptidos. Para una revisión de la química combinatoria y las bibliotecas creadas, ver Myers, Curr Opin Biotechnol, 8:701-07 (1997).

## Usos terapéuticos de los inhibidores

## de la actividad de la PI3Kδ

- 5 **[0089]** La declaración proporciona un método para inhibir selectiva o específicamente la actividad de la PI3Kδ terapéutica o profilácticamente usando compuestos de la invención. El método comprende administrar un inhibidor selectivo o específico de la actividad de la PI3Kδ a un individuo que lo necesite en una cantidad suficiente para inhibir la actividad de la PI3Kδ. El método puede emplearse para tratar a humanos o animales que sufren de, o están sujetos a, una condición cuyos síntomas o patología están mediados por la expresión o actividad de la PI3Kδ.
- 10 **[0090]** “Tratar” como se usa aquí se refiere a prevenir que un trastorno ocurra en un animal que pueda predisponerlo al trastorno, pero aún no se ha diagnosticado que lo tiene; inhibiendo el trastorno, es decir, deteniendo su desarrollo; aliviando el trastorno, es decir, causando su regresión; o mejorando el trastorno, es decir, reduciendo la severidad de los síntomas asociados con el trastorno. “Trastorno” pretende incluir trastornos médicos, enfermedades, condiciones, síndromes, etc., sin limitación.
- 15 **[0091]** Los métodos de la declaración incluyen varios modos de tratar un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate y aún más preferiblemente un humano. Entre los mamíferos que pueden tratarse están, por ejemplo, humanos; animales de compañía (mascotas), incluyendo perros y gatos, animales de granja, incluyendo ganado, caballos, ovejas, cerdos, y cabras; animales de laboratorio, incluyendo ratas, ratones, conejos, cobayas y primates no humanos; y especímenes de zoológico. Los animales no mamíferos incluyen, por ejemplo, aves, peces, reptiles y anfibios.
- 20 **[0092]** Un método de la presente declaración puede emplearse para tratar sujetos, terapéutica o profilácticamente, que sufren, o están sujetos a, un trastorno inflamatorio. Un aspecto de la presente declaración se deriva de la participación de la PI3Kδ mediando los aspectos del proceso inflamatorio. Sin intentar relacionarlo con ninguna teoría, se postula que, debido a que la inflamación implica procesos mediados por la activación de los leucocitos (p.ej., neutrófilos o linfocitos) y la trasmigración quimiotáctica, y debido a que la PI3Kδ puede mediar tales fenómenos, los antagonistas de la PI3Kδ pueden usarse para suprimir la lesión asociada con la inflamación.
- 25 **[0093]** “Trastorno inflamatorio” tal como se usa aquí puede referirse a cualquier enfermedad, trastorno o síndrome en el cual una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño tisular al hospedador o pérdida de la función tisular. “Trastorno inflamatorio” también se refiere a un estado patológico mediado por la entrada de leucocitos y/o quimiotaxis de neutrófilos.
- 30 **[0094]** “Inflamación” tal como se usa aquí se refiere a una respuesta localizada protectora inducida por la lesión o destrucción de los tejidos, la cual sirve para destruir, diluir o secuestrar al agente lesivo y al tejido lesionado. La inflamación se asocia con una entrada de leucocitos y/o quimiotaxis de neutrófilos. La inflamación puede resultar de la infección con organismos patógenos y virus, y de medios no infecciosos tales como el traumatismo o la reperusión luego del infarto miocárdico o el ictus, la respuesta inmune a un antígeno foráneo y las respuestas autoinmunes. Por consiguiente, los trastornos inflamatorios idóneos para la invención incluyen trastornos asociados con reacciones del sistema de defensa específico así como con reacciones del sistema de defensa inespecífico.
- 35 **[0095]** Como se usa aquí, el término “sistema de defensa específico” se refiere al componente del sistema inmune que reacciona a la presencia de antígenos específicos. Ejemplos de inflamación resultantes de una respuesta del sistema de defensa específico incluyen la respuesta clásica a los antígenos foráneos, las enfermedades autoinmunes y la respuesta de hipersensibilidad tardía mediada por los linfocitos T. Las enfermedades inflamatorias crónicas, el rechazo de tejidos y órganos sólidos trasplantados, p.ej., trasplantes de riñón y médula ósea, y la enfermedad de injerto versus hospedador, son ejemplos de las reacciones inflamatorias del sistema de defensa específico.
- 40 **[0096]** El término “sistema de defensa inespecífico” tal como se usa aquí se refiere a trastornos inflamatorios mediados por leucocitos que no son capaces de memoria inmunológica (p.ej., granulocitos y macrófagos). Ejemplos de inflamación que resultan, al menos en parte, de una reacción del sistema de defensa inespecífico, incluyen la inflamación asociada con condiciones tales como el síndrome de distrés respiratorio (agudo) del adulto (ARDS) o síndromes de lesión multiorgánica; lesión por reperusión; glomerulonefritis aguda; artritis reactiva; dermatosis con componentes inflamatorios agudos; meningitis purulante aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central tales como el ictus; lesión térmica; enfermedad inflamatoria intestinal; síndromes asociados a la trasfusión de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas.
- 45 **[0097]** “Enfermedad autoinmune” tal como se usa aquí se refiere a cualquier grupo de trastornos en los cuales la lesión se asocia con respuestas humorales o celulares a los constituyentes propios del cuerpo. “Enfermedad alérgica” tal como se usa aquí se refiere a cualquier síntoma, daño tisular o pérdida de función tisular resultante de la alergia. “Enfermedad artrítica” tal como se usa aquí se refiere a cualquier enfermedad que se caracteriza por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a una variedad de etiologías. “Dermatitis” tal como se usa aquí se refiere a cualquiera de una gran familia de enfermedades de la piel que se caracterizan por inflamación de la piel atribuible a una variedad de etiologías. “Rechazo de trasplante” tal como se usa aquí se refiere a cualquier reacción
- 50
- 55
- 60
- 65

inmune dirigida contra el tejido injertado, tales como órganos y células (p.ej., médula ósea), caracterizada por una pérdida de función de los tejidos injertados y circundantes, dolor, inflamación, leucocitosis y trombocitopenia.

**[0098]** Los métodos terapéuticos de la presente declaración incluyen métodos para el tratamiento de los trastornos asociados con la activación de células inflamatorias. "Activación de células inflamatorias" se refiere a la inducción por un estímulo (incluyendo, pero no limitada a, citoquinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo pero no limitados a citoquinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoides o aminas vasoactivas), o la expresión en la superficie celular de números nuevos o elevados de mediadores (incluyendo, pero no limitados a, antígenos mayores de histocompatibilidad o moléculas de adherencia celular) en las células inflamatorias (incluyendo pero no limitadas a monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (es decir, leucocitos polimorfonucleares tales como neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los entendidos en la materia apreciarán que la activación de una o una combinación de estos fenotipos en estas células pueden contribuir al inicio, perpetuación o exacerbación de un trastorno inflamatorio.

**[0099]** Se han encontrado que los compuestos de la presente invención inhiben la liberación de superóxido por los neutrófilos. El superóxido es liberado por los neutrófilos en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo señales de infección, como un mecanismo de muerte celular. Por ejemplo, se sabe que la liberación de superóxido es inducida por el factor alfa de necrosis tumoral ( $TNF\alpha$ ), el cual es liberado por los macrófagos, mastocitos y linfocitos en contacto con componentes de la pared celular bacteriana tales como el lipopolisacárido (LPS). El  $TNF\alpha$  es un activador extraordinariamente potente y promiscuo de los procesos inflamatorios, involucrado en la activación de neutrófilos y otros tipos celulares, la inducción de la adherencia de los leucocitos a las células endoteliales, pirexia, aumento de la producción de la clase I del MHC y la estimulación de la angiogénesis. Alternativamente, la liberación de superóxido puede estimularse por formil-Met-Leu-Phe (fMLP) u otros péptidos en el terminal N por metionina formilada. Tales péptidos normalmente no se encuentran en los eucariotas, sino que son característicos de las bacterias, y señalan la presencia de bacterias al sistema inmune. Los leucocitos que expresan el receptor fMLP, p.ej., neutrófilos y macrófagos, son estimulados a migrar a los gradientes de estos péptidos (es decir, quimiotaxis) hacia los sitios de infección. Como se demuestra aquí, los compuestos de la presente invención inhiben la liberación estimulada de superóxido por los neutrófilos en respuesta al  $TNF\alpha$  o fMLP. Otras funciones de los neutrófilos, incluyendo la exocitosis estimulada y la migración quimiotáctica dirigida, también son inhibidas por los inhibidores de la PI3K $\delta$  de la invención. Por consiguiente, puede esperarse que los compuestos de la presente invención sean útiles tratando trastornos tales como los trastornos inflamatorios, que son mediados por cualquiera o por todas estas funciones de los neutrófilos.

**[0100]** La presente invención permite métodos de tratar enfermedades tales como las enfermedades artríticas, tales como la artritis reumatoidea, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis; enfermedad de Behcet; sepsis, choque séptico, choque endotóxico, sepsis por Gram negativos, sepsis por Gram positivos y síndrome de choque tóxico; síndrome de lesión multiorgánica secundaria a septicemia, traumatismo o hemorragia; trastornos oftálmicos, tales como conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y oftalmopatía asociada con la tiroides; granuloma eosinofílico; trastornos pulmonares o respiratorios, como asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica, ARDS, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (p.ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica) silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasia y toxicidad pulmonar por oxígeno; lesión por reperfusión del miocardio, cerebro o extremidades; fibrosis, tal como la fibrosis quística; formación de queloides o formación de tejido cicatricial; aterosclerosis; enfermedades autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Raynaud; trastornos de rechazo del trasplante como la GVHD y el rechazo del aloinjerto; glomerulonefritis crónica; enfermedades intestinales inflamatorias, como la enfermedad intestinal inflamatoria crónica (CIBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y enterocolitis necrotizante; dermatosis inflamatorias tales como la dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis o urticaria; fiebre y mialgias debidas a infección; trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, tales como meningitis, encefalitis y lesión del cerebro o la médula espinal debida a un traumatismo menor; síndrome de Sjögren; enfermedades que afectan la diapédesis del leucocito; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; choque hipovolémico; diabetes mellitus tipo 1; hipersensibilidad aguda y tardía; estados de enfermedad debidos a discracia leucocitaria y metástasis; lesión térmica; síndromes asociados a trasfusión de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas.

**[0101]** El método puede tener utilidad tratando sujetos que sufren, o están sujetos a, lesión por reperfusión, es decir, lesión resultante de situaciones en las cuales un tejido u órgano experimenta un período de isquemia seguido por reperfusión. El término "isquemia" se refiere a anemia tisular localizada debida a la obstrucción del flujo de sangre arterial. La isquemia transitoria seguida por reperfusión característicamente resulta en la activación de neutrófilos y tras migración a través del endotelio de los vasos sanguíneos en el área afectada. La acumulación de los neutrófilos activados a su vez resulta en la generación de metabolitos reactivos de oxígeno, los cuales dañan componentes del tejido u órgano afectado. Este fenómeno de "lesión por reperfusión" se asocia comúnmente con condiciones tales como el ictus vascular (incluyendo isquemia global y focal), choque hemorrágico, isquemia o infarto miocárdico, trasplante de órgano y vasospasmo cerebral. Para ilustrar, la lesión por reperfusión ocurre al terminar los procedimientos de derivación cardiaca o durante el paro cardiaco cuando el corazón, al cual se le evitó que recibiera sangre, comienza a reperfundirse. Se espera que la inhibición de la actividad de la PI3K $\delta$  resultará en cantidades reducidas de lesión por reperfusión en tales situaciones.

5 [0102] Con respecto al sistema nervioso, la isquemia global ocurre cuando el flujo sanguíneo a todo el cerebro cesa por un período. La isquemia global puede resultar por un paro cardíaco. La isquemia focal ocurre cuando una porción del cerebro se priva de su suministro normal de sangre. La isquemia focal puede resultar de la oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, lesión por traumatismo cefálico, edema o tumor cerebral. Incluso si es transitoria, la isquemia global y focal puede causar un amplio daño neuronal. Aunque el daño al tejido nervioso ocurre en horas o incluso días luego de la instalación de la isquemia, puede desarrollarse un daño nervioso permanente en los minutos iniciales luego del cese del flujo sanguíneo al cerebro.

10 [0103] La isquemia también puede ocurrir en el corazón en el infarto miocárdico y otros trastornos cardiovasculares en los cuales las coronarias se han obstruido como resultado de aterosclerosis, trombo o espasmo. Por consiguiente, se cree que la invención es útil para tratar el daño del tejido cardíaco, particularmente el daño que resulta de la isquemia cardíaca o causada por la lesión por reperfusión en los mamíferos.

15 [0104] En otro aspecto, los inhibidores selectivos de la PI3K $\delta$  de la presente invención pueden emplearse en métodos de tratar enfermedades del hueso, especialmente enfermedades en las cuales la función del osteoclasto es anormal o indeseable. Como se muestra a continuación, los compuestos de la presente invención inhiben la función del osteoclasto *in vitro*. Por consiguiente, el uso de tales compuestos y otros inhibidores selectivos de la PI3K $\delta$  pueden tener valor tratando la osteoporosis, enfermedad de Paget y trastornos relacionados con la resorción ósea.

20 [0105] En otro aspecto, la presente declaración incluye métodos de usar los compuestos inhibitorios de la PI3K $\delta$  para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas de origen hematopoyético, preferiblemente células cancerosas de origen linfocítico, y más preferiblemente células cancerosas relacionadas o derivadas de progenitores de los linfocitos B o linfocitos T. Las neoplasias idóneas para tratamiento usando el método de esta invención incluyen, sin limitación, linfomas, p.ej., neoplasias malignas de tejidos linfocíticos y reticuloendoteliales, como el linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfomas linfocíticos, etc; mielomas múltiples; leucemias, como las leucemias linfocíticas, leucemias mieloides (mielógenas) crónicas, etc. En un contexto preferido, los compuestos inhibitorios presentes de la PI3K $\delta$  pueden usarse para inhibir o controlar el crecimiento o la proliferación de las células de la leucemia mieloide (mielógena) crónica. Otras células cancerosas de origen hematopoyético u otro, que expresan p110 $\delta$  también pueden tratarse con la administración de un inhibidor de la PI3K $\delta$  de la presente invención (C. Sawyer et al., Cancer Research, 63(7), 1667-75 (2003)).

30 [0106] En otro aspecto, la declaración incluye un método de suprimir una función de los basófilos y/o mastocitos, permitiendo así el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por la actividad excesiva o indeseable de los basófilos y/o mastocitos. De acuerdo con el método, un compuesto presente puede usarse para inhibir selectivamente la expresión o actividad de la PI3K $\delta$  en los basófilos y/o mastocitos. Preferiblemente, el método emplea un inhibidor de la PI3K $\delta$  en una cantidad suficiente para inhibir la liberación estimulada de histamina por los basófilos y/o mastocitos. Por consiguiente, el uso de un inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$  puede ser valioso tratando enfermedades caracterizadas por la liberación de histamina, es decir, trastornos alérgicos, incluyendo trastornos tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), asma, ARDS, enfisema y trastornos relacionados.

#### Composiciones farmacéuticas

##### 45 de los inhibidores de la actividad de la PI3K $\delta$

50 [0107] Un compuesto de la presente invención puede administrarse como el químico puro, pero es típico, y preferible, administrar el compuesto en forma de una composición o formulación farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un modular de la actividad de la PI3K $\delta$  y un transportador, coadyuvante o vehículo biocompatible. La composición puede incluir la modulación de la actividad de la PI3K $\delta$  como el único agente activo o en combinación con otros agentes, como oligo o polinucleótidos, oligo o polipéptidos, medicamentos u hormonas mezclados con un excipiente u otros transportadores farmacéuticamente aceptables. Los transportadores y otros ingredientes pueden considerarse farmacéuticamente aceptables en tanto sean compatibles con otros ingredientes de la formulación y no deteéren al recipiente.

55 [0108] Las técnicas para la formulación y administración de las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden producirse usando cualquier método convencional, p.ej., mezclando, disolviendo, granulando, haciendo grageas, reduciendo a polvo, emulsiificando, encapsulando, atrapando, derritiendo, secando con spray o liofilizando. Una formulación farmacéutica óptima puede determinarse por alguien experto en la materia dependiendo de la vía de administración y la dosis deseada. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación *in vivo* y tasa de depuración *in vivo* del agente administrado. Dependiendo de la condición que se está tratando, estas composiciones farmacéuticas pueden formularse y administrarse sistémica o localmente.

65

**[0109]** Las composiciones farmacéuticas se formulan para contener transportadores farmacéuticamente idóneos, y opcionalmente pueden comprender excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. El modo de administración generalmente determina la naturaleza del transportador. Por ejemplo, las formulaciones para la administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas de los compuestos activos en forma hidrosoluble. Los transportadores idóneos para la administración parenteral pueden seleccionarse entre solución fisiológica, solución fisiológica amortiguada, dextrosa, agua y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los transportadores preferidos para la administración parenteral son amortiguadores fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, solución de Ringer o solución fisiológicamente amortiguada. Para la administración tisular o celular, los penetrantes apropiados para la barrera particular a permear se usan en la formulación. Tales penetrantes generalmente son conocidos por los expertos en la materia. Para preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizantes, tales como polioles (p.ej., sucrosa) y/o surfactantes (p.ej., surfactantes no iónicos), etc.

**[0110]** Alternativamente, las formulaciones para el uso parenteral pueden comprender dispersiones o suspensiones de los compuestos activos preparadas como suspensiones para inyección oleosa apropiada. Los solventes lipofílicos o vehículos idóneos incluyen aceites grasos, tales como el aceite de sésamo y ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como el oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano y sus mezclas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes idóneos o agentes que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Los polímeros acuosos que proporcionan solubilización sensible al pH y/o liberación sostenida del agente activo también pueden usarse como coberturas o estructuras de matriz, p.ej., polímeros metacrílicos, como la serie EUDRAGIT® disponibles desde Rohm America Inc. (Piscataway, NJ). Las emulsiones, p.ej., dispersiones de aceite en agua y agua en aceite, también pueden usarse, opcionalmente estabilizado por un agente emulsificante o dispersante (materiales activos de superficie; surfactantes). Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isostearyl etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitan, microcristalina celulosa, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, goma tragacanto y sus mezclas.

**[0111]** Los liposomas que contienen el agente activo también pueden emplearse para la administración parenteral. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Las composiciones en forma de liposoma también pueden contener otros ingredientes, tales como estabilizantes, preservativos, excipientes, etc. Los lípidos preferidos incluyen fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas), naturales y sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos por los expertos en la materia. Ver, p.ej., Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Vol. XIV, p. 33, Academic Press, New York (1976).

**[0112]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente en dosis idóneas para la administración oral pueden formularse usando transportadores farmacéuticamente aceptables conocidos por los expertos en el área. Las preparaciones formuladas para la administración oral pueden ser en la forma de tabletas, pastillas, cápsulas, cachets, grageas, rombos, líquidos, geles, jarabes, lechadas, elixires, suspensiones o polvos. Para ilustrar, las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, luego de agregar auxiliares idóneos si se desea, para obtener los núcleos de las tabletas o grageas. Las formulaciones orales pueden emplear transportadores líquidos similares en tipo a los descritos para el uso parenteral, p.ej., soluciones acuosas amortiguadas, suspensiones, etc.

**[0113]** Las formulaciones orales preferidas incluyen tabletas, grageas y cápsulas de gelatina. Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes, los cuales contienen, sin limitación:

- a) diluyentes, tales como azúcares, incluyendo lactosa, dextrosa, sucrosa, manitol o sorbitol;
- b) aglutinantes tales como silicato de magnesio aluminio, almidón de maíz, trigo, arroz, patata, etc;
- c) materiales de celulosa, tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetil celulosa y carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, gomas, como la goma arábiga y la goma tragacanto, y proteínas, como gelatina y colágeno;
- d) agentes desintegrantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona cruzada, almidones, agar, ácido alginico o una sal, tal como alginato de sodio, o composiciones efervescentes;
- e) lubricantes, tales como sílice, talco, ácido esteárico o su sal de magnesio o calcio, y polietilenglicol;
- f) saborizantes y endulzantes;
- g) colorantes o pigmentos; p.ej., identificar el producto o caracterizar la cantidad (dosis) del compuesto activo; y
- h) otros ingredientes, como preservativos, estabilizantes, agentes de hinchamiento, agentes emulsificantes, promotores de solución, sales para regular la presión osmótica y amortiguadores.

**[0114]** Las cápsulas de gelatina incluyen cápsulas de dos piezas hechas con gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y una cubierta tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de dos piezas pueden contener los ingredientes activos mezclados con rellenos. aglutinantes, lubricantes y/o estabilizantes, etc. En las cápsulas

blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos idóneos, como aceites, parafina líquida o polietilenglicol líquido con o sin estabilizantes.

**[0115]** Los núcleos de las grageas pueden tener cubiertas idóneas tales como soluciones concentradas de azúcar, las cuales también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes idóneos.

**[0116]** La composición farmacéutica puede proporcionarse como una sal del agente activo. Las sales son más solubles en solventes acuosos u otros protónicos que las formas ácidas o base libre correspondientes. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas por los expertos en el área. Los compuestos que contienen fracciones ácidas pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cationes idóneos. Los cationes farmacéuticamente aceptables idóneos incluyen, por ejemplo, metal alcalino (p.ej., sodio o potasio) y cationes de tierra alcalina (p.ej., calcio o magnesio).

**[0117]** Los compuestos de fórmula estructural (I) y (II) que contienen fracciones básicas pueden formar sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables con ácidos idóneos. Por ejemplo, Berge et al., J. Pharm. Sci., 66:1 (1977), describen las sales farmacéuticamente aceptables en detalle. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención o separadamente reaccionando una función base libre con un ácido idóneo.

**[0118]** Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención generalmente se prefieren en los métodos de la invención. Tal como se usa aquí, el término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales o formas zwitteriónicas de los compuestos de fórmulas estructurales (I) o (II). Los cationes farmacéuticamente aceptables idóneos incluyen metal alcalino (p.ej., sodio o potasio) y cationes de metal tierra alcalina (p.ej., calcio o magnesio). Además, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula estructural (I) y (II) que contienen un centro básico son sales de adición ácida formadas con ácidos farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico y fosfórico, y ácidos orgánicos tales como oxálico, maleico, succínico, malónico y cítrico. Ejemplos no limitantes de sales de compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, clorhídrico, bromhídrico, iohídrico, sulfato, bisulfato, 2-hidroxietansulfonato, fosfato, fosfato de hidrógeno, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, butirato, camforato, camforsulfonato, citrato, digluconato, glicerolfosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, formato, succinato, malonato, fumarato, maleato, metanosulfonato, mesitilensulfonato, naftilensulfonato, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, tricloroacetato, trifluoroacetato, glutamato, bicarbonato, paratoluensulfonato, undecanoato, lactato, citrato, tartrato, gluconato, benceno sulfonato, y p-tolue-nosulfonato. Además, los grupos amino disponibles presentes en los compuestos de la invención pueden cuaternizarse con metil, etil, propil y butil cloruros, bromuros y yoduros; dimetil, dietil, dibutil y diamil sulfates; decil, lauril, miristil y esteril cloruros, bromuros y yoduros; y bencil y fnetil bromuros.

**[0119]** A la luz de lo anterior, cualquier referencia a los compuestos de la presente invención que aparecen aquí pretende incluir sales farmacéuticamente aceptables, solventes, derivados cuaternarios y prodrogas.

**[0120]** Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulada en un transportador farmacéuticamente aceptable pueden prepararse, colocarse en un contenedor apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una condición indicada. Por consiguiente, también se contempla un artículo de fabricación, tal como un contenedor que comprende una forma de dosis de un compuesto de la invención y una etiqueta que contiene instrucciones para el uso del compuesto. También se contemplan kits. Por ejemplo, un kit puede comprender una forma de dosis de una composición farmacéutica y un inserto de paquete que contiene instrucciones para el uso de la composición en el tratamiento de una condición médica. En cualquier caso, las condiciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de trastornos inflamatorios, cáncer, etc.

#### Métodos de administración de

#### los inhibidores de la actividad de la PI3Kδ

**[0121]** Las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la actividad de la PI3Kδ pueden administrarse al sujeto por cualquier método convencional, incluyendo técnicas parenterales y enterales. Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las cuales la composición se administra por una vía distinta al tracto gastrointestinal, por ejemplo, inyecciones intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramedular, intramuscular, intraarticular, intratecal, e intraventricular. Las modalidades de administración enteral incluyen, por ejemplo administración oral, bucal, sublingual y rectal. Las modalidades de administración transepitelial incluyen, por ejemplo, la administración transmucosal y trasdérmica. La administración transmucosal incluye, por ejemplo, la administración enteral así como la administración nasal, inhalación y pulmonar profunda; administración vaginal; y administración bucal y sublingual. La administración trasdérmica incluye modalidades trasdérmicas o trascutáneas pasivas o activas, incluyendo, por ejemplo, parches y equipos de iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, pomadas o ungüentos. La administración parenteral también puede hacerse usando una técnica de alta presión, p.ej., POWDERJECT®.

- 5 **[0122]** Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones depot (reservorios), bombas osmóticas, etc. Una vía preferida de administración para el tratamiento de la inflamación puede ser la administración local o tópica para trastornos localizados tales como artritis, o la administración sistémica para trastornos distribuidos, p.ej., administración intravenosa para lesión por reperfusión o para condiciones sistémicas tales como septicemia. Para otras enfermedades, incluyendo las que involucran al tracto respiratorio, p.ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y enfisema, la administración puede hacerse por inhalación o administración pulmonar profunda de sprays, aerosoles, polvos, etc.
- 10 **[0123]** Para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente leucemias y otras neoplasias distribuidas, se prefiere la administración parenteral. Serían deseables formulaciones de los compuestos para optimizarlos para la biodistribución luego de la administración parenteral. Los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  pueden administrarse antes, durante o después de la administración de quimio o radioterapia y/o cirugía.
- 15 **[0124]** El índice terapéutico de los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  puede aumentarse modificando o derivando los compuestos para la administración dirigida a las células cancerosas que expresan un marcador que identifica las células como tales. Por ejemplo, los compuestos pueden estar unidos a un anticuerpo que reconoce un marcador selectivo o específico para células cancerosas, de forma que los compuestos son llevados a la vecindad de las células para ejercer sus efectos localmente, como se describe previamente (ver por ejemplo, Pietersz et al., Immunol. Rev., 129:57 (1992); Trail et al., Science, 261:212 (1993); y Rowlinson-Busza et al., Curr. Opin. Oncol., 4:1142 (1992)). La administración dirigida al tumor de estos compuestos aumenta el beneficio terapéutico, *inter alia*, minimizando las toxicidades inespecíficas potenciales que pueden resultar de la radio o quimioterapia. En otro aspecto, los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  y radioisótopos o agentes quimioterápicos pueden conjugarse al mismo anticuerpo antitumoral.
- 20 **[0125]** Para el tratamiento de los trastornos de resorción ósea o trastornos mediados por osteoclastos, los inhibidores de la PI3K $\delta$  pueden administrarse por cualquier método idóneo. La administración focal puede ser deseable, como por inyección intrarticular. En algunos casos puede ser deseable acoplar los compuestos a una fracción que pueda dirigir los compuestos al hueso. Por ejemplo, un inhibidor de la PI3K $\delta$  puede acoplarse a compuestos con alta afinidad por la hidroxiapatita, la cual es un constituyente mayor del hueso. Esto puede lograrse, por ejemplo, adaptando un método de acoplamiento a tetraciclina desarrollado para la administración dirigida de estrógeno al hueso (Orme et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 4(11) : 1375-80 (1994)).
- 25 **[0126]** Para ser efectivamente terapéuticos modulando los albos del sistema nervioso central, los agentes usados deben penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica cuando se administran periféricamente. Sin embargo, los compuestos que no pueden penetrar la barrera hematoencefálica pueden administrarse efectivamente por una vía intravenosa.
- 30 **[0127]** Como se nota antes, las características del agente y la formulación del agente pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación in vivo y tasa de depuración in vivo del agente administrado. Tal información farmacocinética y farmacodinámica puede recolectarse a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, confirmados luego en humanos durante el curso de los ensayos clínicos. Así, para cualquier compuesto usado en el método de la invención, puede estimarse una dosis terapéuticamente efectiva inicialmente a partir de ensayos bioquímicos y/o celulares. Luego la dosis puede formularse en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante deseable que module la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ . Al conducirse los estudios en humanos surgirá más información con respecto a los niveles apropiados de dosis y la duración del tratamiento para varias enfermedades y condiciones.
- 35 **[0128]** La toxicidad y eficacia terapéutica de tales compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, p.ej., para determinar la LD<sub>50</sub> (la dosis letal para 50% de la población) y la ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el "índice terapéutico", el cual se expresa como la relación LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Se prefieren compuestos que exhiban grandes índices terapéuticos, es decir, la dosis tóxica es sustancialmente mayor que la dosis efectiva. Los datos obtenidos de tales ensayos de cultivos celulares y estudios adicionales en animales pueden usarse para formular un rango de dosis para el uso en humanos. La dosis de tales compuestos está preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluye la ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad.
- 40 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.
- 45 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.
- 50 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.
- 55 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.
- 60 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.
- 65 **[0129]** De acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier régimen de administración efectiva que regule el momento y la secuencia de dosis. Los compuestos y las composiciones farmacéuticas idóneos para el uso en la presente invención incluyen aquellos donde el ingrediente activo se administra en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. Más específicamente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de la PI3K $\delta$ , y así tratar un individuo que sufre una indicación, o aliviar los síntomas existentes de la indicación. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la declaración detallada aquí.

**[0130]** Niveles ilustrativos de dosis para un ser humano están en el orden de 0.001 miligramos del agente activo por kilogramo de peso corporal (mg/kg) a 1000 mg/kg. Las unidades de dosis del agente activo comprenden entre 0.01 mg a 1000 mg, preferiblemente entre 0.1 mg a 100 mg dependiendo de la indicación, vía de administración y severidad de la condición, por ejemplo. Dependiendo de la vía de la administración, puede calcularse una dosis idónea de acuerdo con el peso corporal, área de superficie corporal o tamaño del órgano. El régimen de dosis final es determinado por el médico tratante en vista de la buena práctica médica, considerando varios factores que modifican la acción de los medicamentos, p.ej., la actividad específica del compuesto, la identidad y severidad del estado de enfermedad, la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, y la severidad de cualquier infección. Factores adicionales que pueden tomarse en cuenta incluyen el tiempo y la frecuencia de administración, combinaciones de medicamentos, sensibilidades de la reacción y tolerancia/respuesta a la terapia. El refinamiento de la dosis apropiada para el tratamiento que implica cualquiera de las formulaciones mencionadas aquí es hecho de rutina por el médico experto sin la experimentación indebida, especialmente a la luz de la información de dosis y ensayos declarados, así como los datos farmacocinéticos observados en los ensayos clínicos humanos. Las dosis apropiadas pueden determinarse a través del uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con los datos de respuesta a la dosis.

**[0131]** La frecuencia de dosificación depende de los parámetros farmacocinéticos del agente y la vía de administración. La dosis y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes de la fracción activa o mantener el efecto deseado. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una sola dosis, múltiples dosis discretas, infusión continua, depots de liberación sostenida o sus combinaciones, como se requiera para mantener un nivel mínimo deseado del agente. Las composiciones farmacéuticas de acción corta (es decir, vida media corta) pueden administrarse una vez al día o más de una vez al día (p.ej., dos, tres o cuatro veces al día). Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Pueden usarse bombas, tales como bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales, para la infusión continua.

**[0132]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar a comprender la invención, y presuponen una comprensión de los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia a los cuales los ejemplos pertenecen, p.ej., la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en tales vectores y plásmidos o la introducción de vectores y plásmidos en las células hospedadoras. Tales métodos se describen en detalle en numerosas publicaciones incluyendo, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Ausubel et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); y Ausubel et al. (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc. (1999). Los materiales y condiciones particulares descritos aquí pretenden ejemplificar aspectos particulares de la invención y no deben construirse para limitar el alcance razonable.

### **EJEMPLO 1**

#### **Preparación y purificación de**

#### **PI3K $\alpha$ , $\beta$ , and $\delta$ recombinante**

**[0133]** Complejos heterodiméricos PI3K recombinantes consistentes en una subunidad catalítica p110 y una subunidad regulatoria p85 se sobrexpresaron usando el sistema de expresión del baculovirus BAC-TO-BAC® HT (GIBCO/BRL) y luego se purificaron para su uso en los ensayos bioquímicos. Las cuatro quinasas de la PI3K Clase I se clonaron en los vectores del baculovirus como sigue:

p110 $\delta$ : Se subclonó una versión etiquetada FLAG® de p110 $\delta$  humana (SEQ ID NOS: 1 and 2) (ver Chantry et al., *J. Biol. Chem.*, 272:19236-41 (1997)) usando técnicas estándar de DNA recombinante en el sitio BamH1-XbaI del vector de expresión de la célula del insecto pFastbac HTb (Life Technologies, Gaithersburg, MD), de forma que el clon estuviera alineado con la etiqueta His del vector. El sistema FLAG® se describe en las U.S. Patent Nos. 4,703,004; 4,782,137; 4,851,341; y 5,011,912, y los reactivos están disponibles en Eastman Kodak Co.

p110 $\alpha$ : Similar al método usado para p110 $\delta$ , descrito antes, se subclonó una versión etiquetada FLAG® de p110 $\alpha$  (ver Volinia et al., *Genomics*, 24 (3): 427-77 (1994)) en los sitios BamH1-HindIII de pFastbac HTb (Life Technologies) de forma que el clon estuviera alineado con la etiqueta His del vector. p110 $\beta$ : Se amplificó un clon p110 $\beta$  (ver Hu et al., *Mol. Cell. Biol.*, 13:7677-88 (1993)) a partir del MARATHON® humano Biblioteca de cDNA del bazo (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante usando los siguientes cebadores:

#### **Cebador 5'**

#### **[0134]**

5' -

GATCGAATTCGGCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGCTTCAGTTT  
 CATAATGCCTCC-3' (SEQ ID NO:3)

10 Cebador 3'

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

15 **[0135]** El cebador 5' se contruyó para contener una etiqueta FLAG<sup>®</sup> alineado con la secuencia p110 $\beta$ . Luego de la amplificación, la secuencia FLAG<sup>®</sup>-p110 $\beta$  se subclonó usando técnicas recombinantes estándar en los sitios *EcoR1-NotI* de pFastbac HTa (Life Technologies), de forma que el clon estuviera alineado con la etiqueta His del vector.

20 **[0136]** p110 $\gamma$ : El cDNA p110 $\gamma$  (ver Stoyanov et al., Science, 269:690-93 (1995)) se amplificó a partir de una biblioteca Marathon Ready de cDNA del bazo (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante usando los siguientes cebadores:

Cebador 5'

25 5'-AGAATGCGGCCGCATGGAGCTGGAGAACTATAAACAGCCC-3' (SEQ ID NO:5)

Cebador 3'

30 5'-CGCGGATCCTTAGGCTGAATGTTTCTCTCCTTGTTG-3' (SEQ ID NO:6)

**[0137]** Posteriormente se unió una etiqueta FLAG<sup>®</sup> al extremo 5' de la secuencia p110 $\gamma$  se clonó en los sitios *BamH1-Spe1* de pFastbac HTb (Life Technologies) usando técnicas recombinantes estándar, con la secuencia FLAG<sup>®</sup>-110 $\gamma$  alineada con la etiqueta His del vector.

35 **[0138]** p85 $\alpha$ : Se subclonó un fragmento *BamH1-EcoR1* de cDNA p85 etiquetado FLAG<sup>®</sup> (ver Skolnik et al., Cell, 65:83-89 (1991)) en los sitios *BamH1-EcoR1* del vector pFastbac dual (Life Technologies).

40 **[0139]** Los baculovirus recombinantes que contenían los clones anteriores se generaron usando el protocolo recomendado por el fabricante (Life Technologies). Los baculovirus que expresaban la subunidad catalítica p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , o p110 $\delta$  etiquetada His y la subunidad p85 se coinfectaron con células de insecto Sf21. Para enriquecer el complejo enzimático heterodimérico, se infectó una cantidad en exceso de baculovirus que expresaba la subunidad p85, y la subunidad catalítica p110 etiquetada His que formó complejo con p86 se purificó en columna de afinidad con níquel. Debido a que p110 $\gamma$  no se asocia con p85, se infectaron células Sf21 con baculovirus recombinantes que expresaban solo p110 $\gamma$  etiquetado His. En un abordaje alterno, p101 puede clonarse en el baculovirus para permitir la coexpresión con su pareja preferida de unión p110 $\gamma$ .

50 **[0140]** Las células Sf21 72 horas postinfectadas (3 litros) se cosecharon y homogenizaron en un amortiguador hipotónico (20 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 5 mM KCl, cóctel inhibitorio de proteasa completo (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN), usando un homogenizador Dounce. Los homogenados se centrifugaron a 1,000 x g por 15 min. Los sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 x g por 20 min, seguidos por ultracentrifugación a 100,000 x g por 60 min. La fracción soluble se cargó inmediatamente sobre 10 mL de columna de afinidad de níquel HITRAP<sup>®</sup> (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrados con 50 mL de Amortiguador A (50 mM HEPES-KOH, pH 7.8, 0.5 M NaCl., 10 mM imidazol). La columna se enjuagó extensamente con Amortiguador A, y se eluyó con un gradiente lineal de 10-500 mM de imidazol. La subunidad p85 libre se removió de la columna durante el paso de enjuague y solo se eluyó el complejo enzimático heterodimérico a 250 mM de imidazol. Las alícuotas de las fracciones de níquel se analizaron por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE) teñido con SYPRO<sup>®</sup> Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), y se cuantificó con STORM<sup>®</sup> PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Las fracciones activas se agruparon y cargaron directamente sobre una columna de heparina Hi-trap de 5 mL preequilibrada con Amortiguador B conteniendo 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM ditioneitol (DTT). La columna se enjuagó con 50 mL de Amortiguador B, y se eluyó con un gradiente lineal de 0.05-2 mM de NaCl. Se eluyo un solo pico conteniendo complejo enzimático PI3K a 0.8 M NaCl. El análisis del gel de SDS-poliacrilamida demostró que las fracciones purificada de la enzima PI3K contenían un complejo estequiométrico 1:1 de subunidades p110 y p85. El perfil de proteína del complejo enzimático durante la cromatografía con heparina

correspondía al de la actividad de la quinaa lipídica. Las fracciones activas se agruparon y congelaron bajo nitrógeno líquido.

## EJEMPLOS 2 -6

**[0141]** Debido a que la PI3K $\delta$  se expresa a niveles significativos en los leucocitos, es importante estudiar los efectos del inhibidor selectivo de la PI3K $\delta$  sobre las funciones de los leucocitos. Por consiguiente, se examinaron los efectos de la inhibición de la PI3K $\delta$  en varios tipos de leucocitos. Los neutrófilos se examinaron para determinar los efectos que la inhibición selectiva de la PI3K $\delta$  podría inducir (Ejemplo 2, a continuación). Sorprendentemente se encontró que la inhibición selectiva de la actividad de la PI3K $\delta$  parece asociarse significativamente con la inhibición de algunas pero no todas las funciones características de los neutrófilos activados. Además, también se evaluaron los efectos de la inhibición de la PI3K $\delta$  sobre la función de los linfocitos B y T (Ejemplos 3-4, a continuación). Asimismo, como la PI3K $\delta$  también se expresa en los osteoclastos, se estudió el efecto de la inhibición de la PI3K $\delta$  sobre la función de estas células especializadas (Ejemplo 5, a continuación).

## EJEMPLO 2

### **Caracterización del papel**

#### **de la PI3K $\delta$ en la función neutrofílica**

**[0142]** Los efectos de un inhibidor de la PI3K $\delta$  de la invención sobre las funciones neutrofílicas como la generación de superóxido, exocitosis de la elastasa, quimiotaxis y muerte bacteriana pueden evaluarse.

#### **A. Preparación de neutrófilos**

##### a partir de sangre humana

**[0143]** Se colocaron alícuotas (8 mL) de sangre heparinizados de voluntarios sanos en almohadillas de 3 mL de 7.3% FICOLL<sup>®</sup> (Sigma, St. Louis, MO) y 15.4% HYPaque<sup>®</sup> (Sigma) y se centrifugaron a 900 rpm por 30 min a temperatura ambiente en una centrifuga de tope de mesa (Beckman). Se recolecta la banda rica en neutrófilos justo arriba de la almohadilla FICOLL<sup>®</sup>-HYPaque<sup>®</sup> y se enjuaga con solución de sal balanceada de Hanks (HBSS) que contiene 0.1% gelatina. Los eritrocitos residuales se remueven por lisis hipotónica con 0.2% NaCl. La preparación de neutrófilos se enjuaga dos veces con HBSS conteniendo 0.1% gelatina y se usa inmediatamente.

#### **B. Medición de la producción**

##### de superóxido por los neutrófilos

**[0144]** La generación de superóxido es una de las características de la activación de los neutrófilos. Una variedad de activadores potencian la generación de superóxido por los neutrófilos. Se mide el efecto de un inhibidor de la PI3K $\delta$  sobre la generación de superóxido por tres diferentes agonistas: TNF1 $\alpha$ , IgG, y fMLP, cada uno representando clases separadas de activador. El superóxido generado por los neutrófilos se mide monitorizando un cambio en la absorbancia con la reducción del citocromo C por la modificación del método descrito por Green et al., (pp.14.5.1-14.5.11 in *Supp. 12, Curr. Protocols Immunol.* (Eds., Colligan et al.) (1994)), como sigue. Los platillos individuales de una bandeja de 96 platillos se cubren toda la noche a 4°C con 50  $\mu$ L of 2 mg/mL de solución de fibrinógeno humano o IgG. Los platillos se enjuagan con PBS y se agregan los siguientes reactivos a cada platillo: 50  $\mu$ L de HBSS o superóxido dismutasa (1 mg/mL), 50  $\mu$ L de HBSS o TNF1 $\alpha$  (50 ng/mL), 50  $\mu$ L de citocromo C (2.7 mg/mL), y 100  $\mu$ L de suspensión purificada de neutrófilos humanos purificados ( $2 \times 10^6$  cél/mL). La bandeja se centrifuga por 2 min a 200 rpm y se monitoriza la absorbancia a 550 rpm por 2 h. Para medir las cantidades relativas de superóxido generadas, los valores obtenidos a partir de los platillos que contenían superóxido dismutasa se sustraen de todos, y se normalizan a los valores obtenidos a partir de los platillos sin inhibidor.

**[0145]** Los compuestos de la presente invención inhiben la generación de superóxido inducida por TNF por los neutrófilos de forma dependiente de la concentración. Además, la generación de superóxido inducida por la IgG no fue significativamente inhibida por los compuestos de la presente invención.

**[0146]** También puede estudiarse el efecto de los compuestos de la presente invención sobre la generación de superóxido inducida por otro potente inductor, el péptido bacteriano fMLP. Como la generación de superóxido inducida por THF, la generación de superóxido inducida por fMLP también es inhibida por compuestos de la presente invención. Estos resultados demuestran que los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  de la presente invención pueden evitar la inducción específica del estímulo de la generación de superóxido por los neutrófilos, indicando que la PI3K $\delta$  está implicada en este proceso.

**C. Medición de la exocitosis de elastasa por los neutrófilos**

[0147] Además de la generación de superóxido, los neutrófilos activados también responden liberando varias proteasas que son responsables por la destrucción de tejidos y cartílago durante la inflamación. Como una indicación de liberación de proteasa, se mide el efecto del presente compuesto sobre la exocitosis de elastasa. La exocitosis de elastasa se cuantifica por la modificación del procedimiento descrito por Ossanna et al. (J. Clin. Invest., 77:1939-51 (1986)), como sigue. Neutrófilos humanos purificados ( $0.2 \times 10^6$ ) (tratados con DMSO o una dilución seriada de un compuesto presente en DMSO) son estimulados con fMLP en PBS conteniendo 0.01 mg/mL de citocalasina B, 1.0  $\mu$ M azido de sodio ( $\text{NaN}_3$ ), 5  $\mu$ g/mL de L-metionina y 1  $\mu$ M fMLP por 90 min a 37°C en una bandeja de 96 platillos. Al final del período de incubación, la bandeja se centrifuga por 5 min a 1000 rpm, y 90  $\mu$ L del sobrenadante se transfieren a 10  $\mu$ L de solución 10 mM de un péptido sustrato de la elastasa, MeO-suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, donde MeO-suc = metoxi-succinil; pNA = p-nitroanilida (Calbiochem, San Diego, CA). La absorbancia a 410 nm se monitoriza por 2 h en un lector de bandeja de 96 platillos. Para medir las cantidades relativas de elastasa exocitosada, todos los valores de absorbancia se normalizan a los valores sin inhibidor. Los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  de la presente invención inhiben significativamente la exocitosis de la elastasa inducida por fMLP, y lo hacen de forma dependiente de la dosis.

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

[0148] Los neutrófilos tienen la capacidad intrínseca de migrar a través de los tejidos, y son uno de los primeros tipos celulares que llegan a los sitios de inflamación o lesión tisular. Se mide el efecto de los compuestos presente sobre la migración neutrófilica hacia un gradiente de concentración de fMLP. El día antes que se realicen los ensayos de migración, se cubren 6 bandejas de platillos con proteína de fusión ICAM-1/Fc recombinante (Van der Vieren et al., Immunity, 3:683-90 (1995)) (25  $\mu$ g/mL en amortiguador de bicarbonato, pH 9.3) y se dejan toda la noche a 4°C. Luego de enjuagar, se agrega 1% solución de agarosa, en RPMI-1640 con 0.5% albúmina de suero bovino (BSA), a los platillos con o sin inhibidor, y las bandejas se colocan en un refrigerador antes de abreir agujeros en la agarosa gelificada para crear placas (1 agujero central rodeado por 6 periféricos por platillo).

[0149] Los neutrófilos humanos se obtienen como se describe antes, y se resuspenden en medio RPMI suplementado con 0.5% BSA a  $5 \times 10^6$  células/mL. Luego de combinar volúmenes iguales de suspensión de neutrófilos y medio (con DMSO o una dilución seriada del compuesto en estudio en DMSO), los neutrófilos se alicuotaron en los agujeros periféricos, mientras que el agujero central recibió fMLP (5  $\mu$ M). Las bandejas se incubaron a 37°C en presencia de 5%  $\text{CO}_2$  por 4 h, seguido por terminación de la migración con la adición de solución de glutaraldehído 1% en D-PBS. Luego de remover la capa de agarosa, los platillos se enjuagaron con agua destilada y se secaron.

[0150] El análisis de la migración neutrófilica se conduce en una estación de trabajo videomicroscopio invertido Nikon DIAPHOT® (objetivo 1x) usando el programa NIH 1.61. Usando los programas Microsoft Excel y table Curve 4 (SPSS Inc., Chicago IL.), se obtiene un índice de migración para cada una de las condiciones estudiadas. El índice de migración se define como el área bajo una curva que representa el número de neutrófilos migrados versus la distancia neta de migración por célula.

[0151] Los compuestos inhibitorias de la PI3K $\delta$  de la presente invención tienen un efecto sobre la migración neutrófilica, inhibiendo esta actividad de forma dependiente de la dosis.

**E. Medición de la capacidad bactericida de los neutrófilos**

[0152] Dado que los compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  de la presente invención afectan ciertas funciones de los neutrófilos, es de interés si los compuestos afectan la destrucción bacteriana mediada por los neutrófilos. El efecto de los compuestos sobre la destrucción de *Staphylococcus aureus* mediada por neutrófilos se estudia de acuerdo con el método descrito por Clark y Nauseef (pp. 7.23.4-7.23.6 in Vol. 2, Supp. 6, Curr. Protocols Immunol. (Eds., Colligan et al.) (1994)). Neutrófilos humanos purificados ( $5 \times 10^6$  células/mL) (tratados con DMSO o una dilución seriada de compuesto presente en DMSO) se mezclan con suero autólogo. Células de *S. aureus* que crecieron toda la noche son ejuagadas, resuspendidas en HBSS, y se le agrega al suero neutrófilos opsonizados en una relación 10:1. Se permite que los neutrófilos internalicen las bacterias por fagocitosis por incubación a 37°C por 20 min. Las bacterias no internalizadas son eliminadas por 10 unidades/mL lisostafina a 37°C por 5 min y la mezcla total se rota a 37°C. Las muestras se retiran a varios tiempos hasta 90 min y los neutrófilos son lisados por dilución en agua. Las bacterias viables son contadas por diluciones apropiadas en bandejas sobre una bandeja de tripticasa-soya-agar y contando las colonias de *S. aureus* luego de crecimiento toda la noche.

[0153] La eliminación mediada por neutrófilos de *S. aureus* es similar en las muestras tratadas con DMSO (control) y con un compuesto presente. Por tanto, un inhibidor de la PI3K $\delta$  no afecta significativamente la capacidad de los neutrófilos de eliminar *S. aureus*, sugiriendo que la PI3K $\delta$  no está involucrada en esta vía de función neutrófilica.

EJEMPLO 3**Caracterización del papel de la PI3K $\delta$  en la función del linfocito B**

5 [0154] También se estudian los efectos de un inhibidor de la PI3K sobre las funciones de los linfocitos B incluyendo índices clásicos como la producción de anticuerpos y la proliferación inducida por estímulos específicos.

**A. Preparación y estimulación de linfocitos B a partir de la sangre humana periférica**

10 [0155] Sangre heparinizada (200 mL) de voluntarios sanos se mezcla con un volumen igual de D-PBS en capa sobre 10 x 10 mL FICOLL-PAQUE<sup>®</sup> (Pharmacia), y se centrifuga a 1600 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Se recolectan las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de la interfaz FICOLL<sup>®</sup>/suero, en capa sobre 10 mL de suero bovino fetal (FBS) y centrifugadas a 800 rpm por 10 min para remover las plaquetas. Luego de enjuagadas, las células se incuban con mezcla de anticuerpos DYNAL<sup>®</sup> (kit de linfocitos B) (Dynal Corp., Lake Success, NY) por 20 min a 4-8°C. Luego de la remoción del anticuerpo no unido, los PBL se mezclan con perlas magnéticas cubiertas con IgG antiratón (Dynal) por 20 min a 4-8°C con agitación suave seguida por eliminación de los linfocitos no B marcados sobre el separador de perlas magnéticas. Este procedimiento se repite una vez más. Los linfocitos B son resuspendidos en RPMI-1640 con 10% FBS y se mantienen sobre hielo hasta su uso posterior.

**B. Medición de la producción de anticuerpos por los linfocitos B humanos**

[0156] Para estudiar la producción de anticuerpos, se toman alícuotas de linfocitos B a 50-75 x 10<sup>3</sup> células/platillo en una bandeja de 96 platillos con o sin inhibidor, a los cuales se añaden IL-2 (100 U/mL) y células de PANSORBIN<sup>®</sup> (Calbiochem) *Staphylococcus aureus* (1:90,000). Parte del medio se remueve luego de 24-36 h, y se agrega medio fresco (con o sin inhibidor) e IL-2. Los cultivos se incuban a 37°C en presencia de un incubador CO<sub>2</sub> por 7 días adicionales. Las muestras de cada condición (por triplicado) son removidos, y analizados para IgG e IgM, medidos por ELISA. Brevemente, bandejas de 96 platillos IMMULON<sup>®</sup> 4 son cubiertas (50  $\mu$ L/platillo) con 150 ng/mL de IgG de burro antihumano (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA), o 2  $\mu$ g/mL IgG+IgM de burro antihumano (H+L) (Jackson ImmunoResearch) en amortiguador de bicarbonato, y se deja toda la noche a 4°C. Luego de enjuagar tres veces con solución fisiológica amortiguada con fosfato conteniendo 0.1% TWEEN<sup>®</sup>-80 (PBST) (350 $\mu$ L/platillo), y bloqueando con 3% suero de cabra en PBST (100 $\mu$ L/platillo) por 1h a temperatura ambiente, se agregan muestras (100 $\mu$ L/platillo) de medio de linfocitos B diluido en PBST. Para las bandejas de IgG el rango de dilución es 1:500 a 1:10000 y para IgM 1:50 a 1:1000. Luego de 1 h, las bandejas se exponen a IgG antihumano conjugado con biotina (100 ng/mL) o IgM antihumana (200 ng/mL) (Jackson ImmunoResearch) por 30 min, seguido por estreptavidina-HRP (1:20000) por 30 min, y finalmente a solución TMB (1:100) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:10000) por 5 min, con enjuague con 3 x PBST entre los pasos. El desarrollo de color es detenido por solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y las bandejas se leyeron en un lector de bandejas de ELISA.

[0157] Los compuestos de la presente invención inhibieron la producción de anticuerpos.

**C. Medición de la proliferación de los linfocitos B en respuesta a la estimulación por la IgM de la superficie celular**

[0158] En el experimento anterior, los linfocitos B son estimulados usando PANSORBIN<sup>®</sup>. Se midió también el efecto de los compuestos de la presente invención sobre la respuesta de proliferación de los linfocitos B cuando son estimulados a través de su IgM de superficie celular usando anticuerpo anti-IgM. Se disponen esplenocitos murinos (Balb/c) en bandejas de 96 platillos de microtitulación a 2 x 10<sup>5</sup> células por platillo en 10% FBS/RPMI. Se agregan diluciones apropiadas del inhibidor en estudio en medio completo a las células y las bandejas se incuban por 30-60 minutos antes de la adición del estímulo. Luego de la preincubación con el inhibidor en estudio, se agrega una preparación F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo de cabra específico para la cadena de IgM de ratón a los platillos a una concentración final de 25mg/mL. Las bandejas se incuban a 37°C por 3 días y se agrega 1 $\mu$ Ci de [3H-timidina] a cada bandeja para las cuatro horas finales del cultivo. Las bandejas se cosechan sobre filtros de fibra, se enjuagan y se determina la incorporación de la radiomarca usando un contador beta (Matrix 96, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) y se expresa como cuentas por minuto (CPM).

[0159] Los compuestos de la presente invención inhiben la proliferación de linfocitos B estimulada por anti-IgM de forma dependiente de la dosis. Debido a que los compuestos de la presente invención inhiben la proliferación de linfocitos B, se concibe que estos compuestos y otros inhibidores de la PI3K $\delta$  podrían usarse para suprimir la proliferación indeseable de los linfocitos B en situaciones clínicas. Por ejemplo, en la neoplasia de linfocitos B, los linfocitos B de varias etapas de diferenciación muestran una proliferación no regulada. Basados en los resultados mostrados antes, podemos inferir que los inhibidores selectivos de la PI3K $\delta$  podrían usarse para controlar, limitar o inhibir el crecimiento de tales células.

EJEMPLO 4

65

**Caracterización del papel de la PI3K $\delta$  en la función del linfocito B**

[0160] Se mide la proliferación de linfocitos B en respuesta a la costimulación de CD3+CD28. Se purifican linfocitos T a partir de sangre humana sana por selección negativa usando perlas magnéticas cubiertas con anticuerpo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dyna) y se resuspenden en RPMI. Las células se tratan con DMSO o una dilución seriada de un compuesto presente en DMSO y se disponen en  $1 \times 10^5$  células/platillo en una bandeja de 96 platillos precubierta con IgG de cabra antiratón. Luego se añade anti-CD3 monoclonal de ratón y anticuerpos anti-CD28 a cada platillo a 0.2 ng/mL y 0.2  $\mu$ g/mL, respectivamente. La bandeja se incuba a 37°C por 24 h y se agrega [<sup>3</sup>H]-timidina (1  $\mu$ Ci/platillo). Luego de otras 18 h de incubación, las células son cosechadas con un cosechador automático de células, enjuagadas y se cuantifica la radiactividad incorporada.

[0161] Aunque los compuestos inhibitorios presentes de la PI3K $\delta$  inhibieron la proliferación de linfocitos T inducida por anti-CD3 y anti-CD28, un efecto no es tan fuerte como un efecto sobre los linfocitos B o en algunas de las funciones de los neutrófilos. Por consiguiente, los compuestos presentes no son tóxicos para las células en general.

EJEMPLO 5**Caracterización del papel de la PI3K $\delta$  en la función del osteoclasto**

[0162] Para analizar el efecto de los compuestos inhibitorios presentes de la PI3K $\delta$  sobre los osteoclastos, se aíslan células óseas de ratón con Factores-1 Estimulantes de Colinas de Macrófagos (mCSF-1) y Ligando de Osteoprotegerina (OPGL) en medio con suero ( $\alpha$ MEM con 10% FBS inactivado por calor; Sigma) por 3 días. El día cuatro, cuando los osteoclastos se han desarrollado, se remueve el medio y se cosechan las células. Los osteoclastos se disponen en láminas de dentina a 10<sup>5</sup> células/platillo en medio de crecimiento, es decir  $\alpha$ MEM con 1% suero y 2% BSA con 55  $\mu$ g/mL OPGL y 10 ng/mL mCSF<sup>-1</sup>. Luego de 3 h, el medio se cambia a 1% suero y 1% BSA con o sin osteopontina (25  $\mu$ g/mL) y los inhibidores de la PI3K (100 nM). El medio se cambia cada 24 horas con osteoprotegerina fresca y los inhibidores. A las 72 h, se remueve el medio, y las superficies de dentina se enjuagan con agua para remover los desechos celulares y se tiñe con hematoxilina ácida. La tinción en exceso se enjuaga y las profundidades de las picaduras se cuantifican usando microscopía confocal.

[0163] Los presentes inhibidores de la PI3K tuvieron un efecto inhibitorio sobre la función del osteoclasto. Los inhibidores inespecíficos LY294002 y wortmannina inhibieron la actividad del osteoclasto. Sin embargo, los presentes compuestos inhibidores de la PI3K $\delta$  tuvieron un mayor efecto, y en algunos casos inhibieron casi completamente la actividad osteoclástica.

EJEMPLO 6**Caracterización del papel de la PI3K $\delta$  en la función del basófilo**

[0164] Se evalúa el efecto de un compuesto de la invención sobre la función del basófilo usando un ensayo convencional de liberación de histamina, generalmente de acuerdo con el método descrito en Miura et al., J. Immunol., 162:4198-206 (1999)). Brevemente, se preincuban basófilos enriquecidos con los compuestos en estudio a varias concentraciones de 0.1 nM a 1000 nM por 10 min a 37°C. Luego se agrega IgE policlonal de cabra antihumano (0.1  $\mu$ g/mL) o fMLP, y se deja incubando por 30 min más. Se mide la histamina liberada en el sobrenadante usando una técnica flurométrica automatizada.

[0165] Se observó un descenso dependiente de la dosis en la liberación de histamina para los presentes compuestos cuando los basófilos se estimulan con anti-IgE. Esta supresión de la liberación de histamina fue esencialmente 100% a 1,000 nM. El presente compuesto no indujo efecto cuando los basófilos se estimulan con fMLP. En comparación, el inhibidor no selectivo de la PI3K LY294002 se evalúa a 0.1 nM y 10,000 nM, mostrando una inhibición cercana al 100% de la liberación de histamina a la mayor concentración.

[0166] Esto indica que los presentes inhibidores de la actividad de la PI3K $\delta$  pueden usarse para suprimir la liberación de histamina, la cual es una de los mediadores de la alergia. Debido a que se requiere la actividad de varias PI 3-quinazas para el tráfico, secreción, y exocitosis de proteínas en muchos tipos celulares, lo anterior sugiere que la liberación de histamina por otras células, como los mastocitos, también puede alterarse por los inhibidores selectiva de la PI 3-quinada delta.

EJEMPLOS DE SÍNTESIS QUÍMICA

[0167] A continuación se proporcionan ejemplos no limitantes específicos. Los expertos en el área comprenden que pueden emplearse grupos protectores donde sea necesario de acuerdo con los principios generales de la química sintética. Estos grupos protectores son removidos en los pasos finales de la síntesis bajo condiciones básicas, ácidas o hidrogenolíticas aparentes para los expertos en el área. Empleando la manipulación y protección apropiada de las funcionalidades químicas, la síntesis de los compuestos de fórmulas estructurales (I) o (II) no

específicamente explicados aquí puede lograrse por métodos análogos a los esquemas y procedimientos sintéticos demostrados establecidos aquí.

5 **[0168]** A menos que se note otra cosa, todos los materiales de inicio se obtuvieron a partir de suplidores comerciales y se usaron sin purificación. Todas las reacciones y fracciones cromatográficas se analizaron por cromatografía de capa delgada (TLC) en bandejas de gel de sílice de 250 mm, visualizados con luz ultravioleta (UV) o tinción con yoduro (I<sub>2</sub>). Los productos e intermediarios se purificaron por cromatografía flash o cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa.

10 **[0169]** Se usan las siguientes abreviaturas en los ejemplos sintéticos: aq (acuoso), h (hora), min (minutos), sat'd (saturado), eq (equivalentes), THF (tetrahidrofurano), RT (temperatura ambiente), Et<sub>3</sub>N (triethylamina), Zn (metal de polvo zinc), n-BuOH (n-butyl alcohol), N-BuLi (n-butyl litio), t-BuOH (alcohol butílico terciario), NaCl (cloruro de sodio), MgSO<sub>4</sub> (sulfato de magnesio), BOC ((C(=O)OtBu), CDCl<sub>3</sub> (cloroformo deuterado), MtBe metil tert-butil éter), H<sub>2</sub>O (agua), CHCl<sub>3</sub> (cloroformo), HCl (ácido clorhídrico), MeOH (metanol), NaOH (hidróxido de sodio), NaOMe (metóxido de sodio); TFA (ácido trifluoroacético), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (carbonato de potasio), SOCl<sub>2</sub> (cloruro de tionilo), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (cloruro de metileno), EtOAc (acetato de etilo), DMF (dimetilformamida), EtOH (etanol), DMSO (dimetil sulfóxido), NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sodio), TLC (cromatografía en capa delgada), HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño), espectrometría de masa por ionización de electrospray (ESI-MS) o MS (ES), HOBT (hidroxibenzotriazol), EDC (etildietilaminopropilcarbodiimida), DIEA (diisopropil-etilamina), HOAc (ácido acético), ACCUFLUOR<sup>®</sup> NFSi (N-fluorobis(fenilsulfonil)aminy) y otras abreviaturas estándar similares se usan aquí.

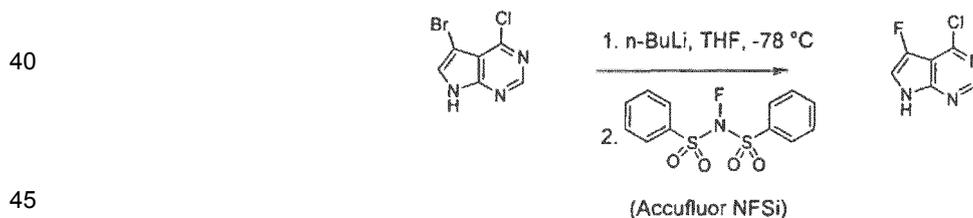
### **EJEMPLO 7** (Referencia)

#### PREPARACIÓN DE COMPUESTOS INTERMEDIOS

##### 25 **4-cloro-5-fluoro-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidine (1)**

30 **[0170]** Se trató una solución de 9-cloro-5-bromo-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidine (800 mg, 3.45 mmol) en THF (50 mL) a -78°C con n-BuLi (1.6 M en hexano, 2.2 eq, 7.6 mmol, 4.7 mL) gota a gota, y se agitó por 30 minutos a la misma temperatura. La mezcla se trató con una solución de ACCUFLUOR<sup>®</sup> NFSi (2.0 eq, 7 mmol, 2.2 g) en THF (10 mL). A la mezcla de la reacción se le permitió calentarse a temperatura ambiente, se agitó por 10 h y luego se concentró hasta la sequedad. El residuo se diluyó en EtOAc (100 mL), se enjuagó con agua (3 x 15 mL) y salmuera (15 mL), y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se purificó por HPLC de fase inversa (10 x 250 mm C18 columna Luna, 4.7 mL/min, 10-90% acetronitrilo en agua por 20 min) para proporcionar el compuesto intermedio 1. ESI-MS m/z = 172.1 (MH<sup>+</sup>).

35 **[0171]** La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 1 se muestran a continuación.



##### 2-amino-6-morfolin-4-ilmetil-N-fenil-benzamida (2)

50 **[0172]** El compuesto intermedio 2 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-F a continuación.

##### metil éster de ácido 6-nitro-benzoico (3)

55 **[0173]** Paso A: Una solución de ácido 6-nitro benzoico en benceno se trató con cloruro de tionilo (2.5 eq) y se agitó a reflujo por 8 h. Luego de la evaporación, el residuo se disolvió en cloroformo y luego se trató con metanol. Luego de agitar a reflujo por 3 h, la mezcla se evaporó para lograr el compuesto 3.

##### metil éster de 2-bromometil ácido -6-nitro-benzoico (4)

60 **[0174]** Paso B: Una mezcla del compuesto 3 (2 g), N-bromosuccinimida (1.93 g) y peróxido de benzoilo (0.124 g) en tetracloruro de carbono (30 mL) se agitó a reflujo toda la noche. Luego de enfriar, los sólidos fueron filtrados y el filtrado se concentró para rendir el compuesto 4 como un aceite amarillo crudo.

##### metil éster de 2-morfolin-4-ilmetil ácido -6-nitro-benzoico (5)

65

**[0175]** Paso C: Una mezcla del compuesto 4 (3.5 g de material crudo), morfolina (0.99 g), carbonato de potasio (2.89 g) y yoduro de potasio (1.66 g) en DMF (22 mL) se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de la reacción se vertió en agua (30 mL) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL). Los extractos orgánicos combinados se enjuagaron con salmuera (30 mL), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron a un residuo. El material crudo fue purificado por cromatografía flash (gel de sílice, 30-50% acetato de etilo/hexanos) para rendir el compuesto 5 como un sólido amarillo.

2-morfolin-4-ilmetil ácido -6-nitro-benzoico (6)

**[0176]** Paso D: Una solución del compuesto 5 (0.85 g) y NaOH (0.304 g) en una mezcla de agua (9 mL), metanol (5 mL), y THF (45 mL) se agitó a reflujo por 24 h y se concentró hasta la sequedad. El residuo se disolvió en agua, y la solución se enfrió a 0°C y ajustó a pH 7 con 10% sulfato de potasio hidrógeno. La mezcla se concentró hasta la sequedad, el residuo fue tratado con metanol y se filtró para remover los sólidos. El filtrado se concentró para rendir el compuesto 6 como un sólido amarillo.

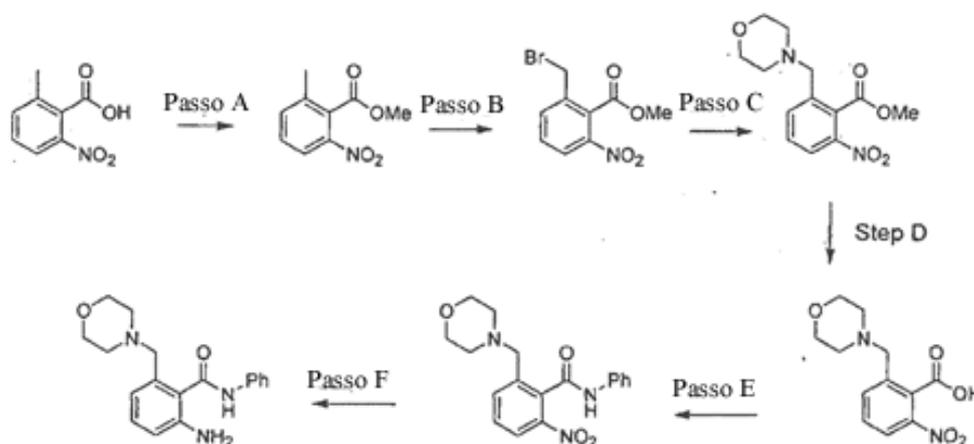
2-morfolin-4-ilmetil-6-nitro-N-fenil-benzamida (7)

**[0177]** Paso E: Se trató una solución del compuesto 6 (0.62 gr, 2.3 mmol) en THF (50 mL) con cloruro de tionilo (0.94 mL), se agitó a temperatura ambiente por 4 h, y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en THF (50 mL) y se trató con anilina (0.58 mL, 6.4 mmol) y diisopropiletilamina (1.12 mL, 6.4 mmol). La mezcla de la reacción se agitó por 4 h, se concentró, se disolvió en diclorometano (50 mL), se enjuagó con bicarbonato de sodio acuoso saturado (25 mL) y salmuera (25 mL), se secó con sulfato de sodio y se concentró. El residuo crudo del compuesto 7 se purificó luego por cromatografía flash (5% metanol en diclorometano).

2-amino-6-morfolin-4-ilmetil-N-fenil-benzamida (2)

**[0178]** Paso F: Una solución del compuesto 7 (0.3 g) y 10% Pd/C (30 mg) en metanol (35 mL) se agitó bajo hidrógeno (1 atm) por 1.5 h. La mezcla se filtró a través de un lecho de CELITE® y el filtrado se concentró para proporcionar un producto sólido amarillo, compuesto intermedio 2. ESI-MS m/z = 312 (MH<sup>+</sup>).

**[0179]** Los pasos A-F y los compuestos 2-7 se muestran en el esquema de la reacción abajo.



2-morfolin-4-ilmetil-fenilamina (8)

**[0180]** El compuesto intermedio 8 (mostrado abajo) se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B.

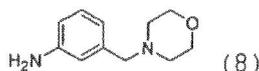
4-(3-nitrobenzil)morfolina (9)

**[0181]** Paso A: Se cargó un matraz de fondo redondo, cuello de 250 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con 1-clorometil-3-nitrobenzenceno (10.0 g, 58.3 mmol), morfolina (15.0 g, 175 mmol) y tolueno (75 mL), y la solución se calentó a reflujo por 2.5 h. A la mezcla de la reacción se le permitió enfriarse a temperatura ambiente luego se enjuagó con 1N hidróxido de sodio acuoso (2 x 50 mL). La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 mL), y los extractos combinados se secaron sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida

para lograr el compuesto 9 como un sólido blanco.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.22 (s, 1H), 8.12 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 7.68 (d, 1H,  $J = 7.6$  Hz), 7.49 (t, 1H,  $J = 7.9$  Hz), 3.73 (m, 4H), 3.59 (s, 2H), 2.46 (m, 4H).

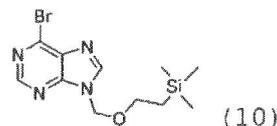
### 3-morfolin-4-ilmetil-fenilamina (8)

**[0182]** Paso B: Se cargó un matraz de fondo redondo, tres cuellos de 250 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con el compuesto 9 (12.7 g, 57.4 mmol), polvo de hierro (40.0 g, 71.7 mmol), ácido clorhídrico 2N (20 mL) y etanol (75 mL). La suspensión resultante se calentó a reflujo por 2 h. Luego de este tiempo a la mezcla se le permitió enfriarse y se filtró a través de un lecho de CELITE<sup>®</sup> 521. El filtrado se concentró bajo presión reducida, el residuo se diluyó con agua (100 mL) y se alcalinizó con carbonato de potasio sólido a pH 10. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 75 mL), y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron bajo presión reducida para lograr el compuesto 8 como un aceite viscoso oscuro.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.09 (t, 1H,  $J = 8.1$  Hz), 6.70 (m, 2H), 6.58 (m, 1H), 3.70 (m, 4H), 3.40 (bs, 2H), 2.44 (m, 4H). El Compuesto 8 intermedio se muestra abajo.



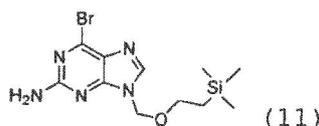
### 6-bromo-9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purina (10)

**[0183]** Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 500 mL equipado con un agitador magnético con 6-bromopurina (10.4 g, 52.0 mmol), carbonato de potasio (21.5 g, 156 mmol), tamices moleculares de 4Å (22.6 g), dimetilformamida (200 mL) y cloruro de 2-(trimetilsilil)etoximetil (13.2 g, 78.0 mmol). La mezcla de la reacción se agitó por 18 h a temperatura ambiente luego se filtró con la ayuda de CELITE<sup>®</sup>521. La concentración del filtrado bajo alto vacío seguida por cromatografía de columna dio un rendimiento de 57% del compuesto intermedio 10 como un sólido blanco. m.p. 49-52 °C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.95 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 3.69 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 0.93 (t, 2H,  $J = 8.2$  Hz), 0.08 (s, 9H);  $m/z = 330$  (M+H). El Compuesto 10 intermedio se muestra abajo.



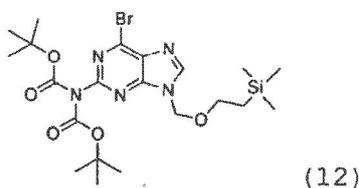
### 2-amino-6-bromo-9-(2-trimetilsililetoxi)metil-9H-purina (11)

**[0184]** El compuesto intermedio 11 se preparó usando el método descrito antes con respecto al compuesto intermedio 10, pero se usó 1-amino-6-bromopurina en lugar de 6-bromopurina. El Compuesto 11 intermedio se muestra abajo.



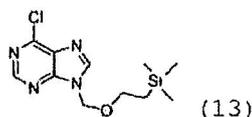
### 2-di-tert-butiloxycarbonilamino-6-bromo-9-2-trimetilsililetoxi)metil-9H-urine (12)

**[0185]** Se purgó un matraz de fondo redondo de un cuello de 250 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con el compuesto intermedio 11 (11.7 g, 34.0 mmol), di-*tert*-butil dicarbonato (22.2 g, 102 mmol), DMAP (581 mg, 4.76 mmol) y tetrahidrofurano anhidro (150 mL). La mezcla de la reacción se agitó por 18 h a temperatura ambiente y luego se evaporó a la sequedad. La cromatografía de columna del residuo resultante rindió el compuesto intermedio 12 como un sólido blanco. m.p 93-95 °C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.99 (s, 1H), 5.71 (s, 2H), 3.66 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 1.47 (s, 18H), 0.92 (t, 2H,  $J = 8.2$  Hz);  $m/z = 546$  (M+H). El Compuesto 12 intermedio se muestra abajo.



6-cloro-9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purina (13)

[0186] El compuesto intermedio 13 se preparó usando el método descrito antes con respecto al compuesto intermedio 10, pero se usó 6-cloropurina en lugar de 6-bromopurina. El Compuesto 13 intermedio se muestra abajo.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

[0187] Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por los siguientes métodos. Compuestos adicionales se preparan usando uno de los siguientes métodos y seleccionando los materiales de inicio y reactivos apropiados. Los procedimientos generales y específicos para sintetizar los presentes compuestos también se establecen en la U.S. Patent No. 6,518,277.

EJEMPLO 8 (Referencia)PREPARACIÓN DEL COMPUESTO

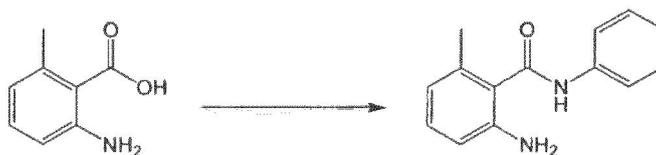
[0188] Los compuestos de acuerdo con la fórmula general I (mostrada antes) se han preparado de acuerdo con los procedimientos sintéticos ilustrativos descritos más abajo.

5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (14)

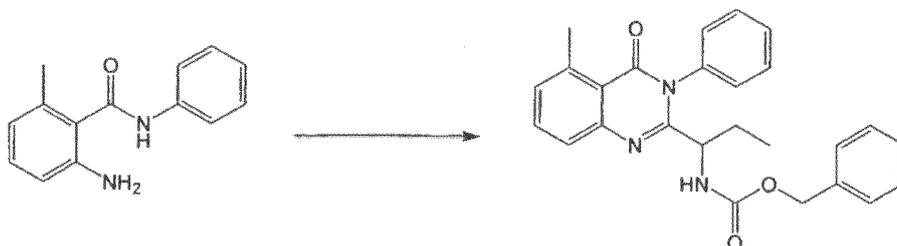
[0189] El compuesto 14 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-D a continuación.

2-amino-6-metil-N-fenil-benzamida (15)

[0190] Paso A: Se agregó cloruro de tionilo (14.5 mL, 198 mmol) a una solución de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (10.0 g, 66.1 mmol) en benceno (250 mL). La suspensión resultante se calentó a reflujo y se agitó toda la noche. Luego de enfriar, la reacción se concentró in vacuo, y el residuo resultante se disolvió en cloroformo (300 mL). Se agregó anilina (15 mL, 165 mmol), y la mezcla se calentó a reflujo. Luego de tres horas, a la reacción se le permitió enfriarse y la suspensión resultante se filtró. El filtrado fue sometido a cromatografía flash, y el producto crudo se recristalizó a partir de isopropanol para proporcionar el compuesto 15 como un sólido cristalino amarillo. MS (ES): m/z 227 (M + H), 134. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.26 (s, 1H), 7.75 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 7.32 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.07 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 7.00 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 6.58 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.46 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.98 (br. s, 2H), 2.21 (s, 3H). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 15 se muestran a continuación.

éster bencil de ácido [1-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)propil]-carbámico (16)

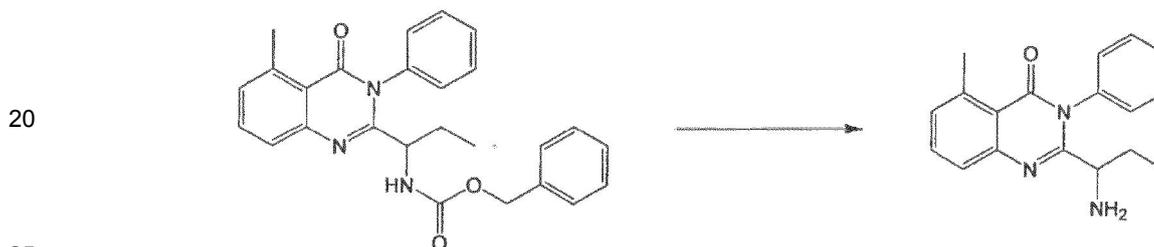
[0191] Paso B: El compuesto 15 (1.20 g, 5.30 mmol) se combinó con 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster de ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico (2.13 g, 6.36 mmol), dimetilaminopiridina (915 mg, 7.49 mmol) y diisopropiletilamina (1.10 mL, 6.36 mmol) en tolueno (15 mL). La mezcla se calentó a 110°C y se agitó a esa temperatura por 22 horas. Luego de enfriarse, la reacción se purificó por cromatografía flash para proporcionar la quinazolinona (16) como un sólido amarillo pálido. (ES): m/z 428 (M + H). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 10.26 (s, 1H), 7.75 (d, 2H, J = 7.9 Hz), 7.32 (t, 2H, J = 7.8 Hz), 7.07 (t, 1H, J = 7.3 Hz), 7.00 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 6.58 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 6.46 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 4.98 (br. s, 2H), 2.21 (s, 3H). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 16 se muestran a continuación.



5

2-(1-amino-propil)-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (17)

[0192] Paso C: Se agregó una cantidad catalítica de 10% Pd/C a una solución del compuesto 16 (691 mg, 1.62 mmol) en etanol (8 mL). La mezcla resultante se colocó bajo una atmósfera de hidrógeno (presión de balón) y se le permitió agitar a temperatura ambiente toda la noche. La reacción se filtró, y el filtrado se concentró *in vacuo*. El residuo crudo resultante se purificó por cromatografía flash para lograr la amina libre, compuesto 17, como un aceite amarillo pálido. (ES):  $m/z$  294 (M + H), 237.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.68 (t, 1H, J = 7.7 Hz), 7.49 - 7.63 (m, 3H), 7.43 - 7.49 (m, 1H), 7.36 - 7.43 (m, 1H), 7.19 - 7.34 (m, 2H), 4.03 - 4.19 (m, 1H), 2.72 (s, 3H), 2.04 (br. s, 2H), 1.63 - 1.79 (m, 1H), 1.29 - 1.44 (m, 1H), 0.68 (t, 3H, J = 7.3 Hz). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 17 se muestran a continuación.



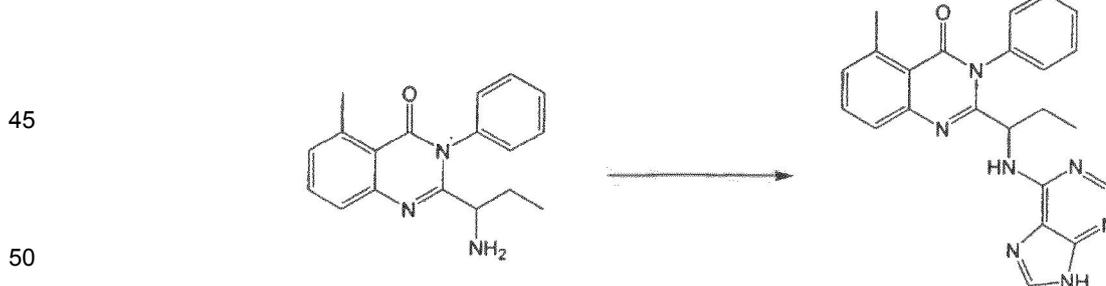
[0193] Paso C (procedimiento alternativo): Se agrega ácido trifluoroacético a una solución del compuesto 16 con amina protegida Boc en diclorometano. A la solución resultante se le permitió agitarse a temperatura ambiente hasta que la LCMS o TLC indicaran el consumo completo del material inicial. La reacción se concentró *in vacuo*, y el residuo fue purificado por cromatografía flash para proporcionar la amina libre 17.

30

5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (14)

[0194] Paso D: El compuesto 17 (100 mg, 0.341 mmol) se combinó con 6-bromo purina (75 mg, 0.375 mmol) y diisopropiletilamina (65  $\mu\text{L}$ , 0.375 mmol) en *n*-butanol (1.0 mL). La reacción se selló, se calentó a 120°C y se agitó por 18 horas. A la solución se le permitió enfriarse, luego se concentró *in vacuo*. El residuo resultante se purificó por HPLC prep para proporcionar el compuesto 14 como un sólido oliva. (ES):  $m/z$  412 (M + H), 206.  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.96 - 9.06 (br. m, 1H), 8.53 (br. s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.68 (t, 1H, J = 7.8 Hz), 7.45 - 7.62 (m, 6H), 7.31 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 4.76 - 4.86 (m, 1H), 2.73 (s, 3H), 1.98 - 2.11 (m, 1H), 1.76 - 1.94 (m, 1H), 0.79 (t, 3H, J = 7.2 Hz). La reacción descrita antes y el compuesto 14 se muestran a continuación.

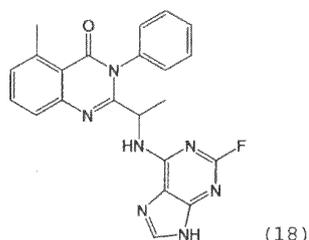
40

2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (18)

[0195] El compuesto 18 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se usó 2-fluoro-6-cloropurina en lugar de 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  416.1 (MH $^+$ ). El Compuesto 18 se muestra abajo.

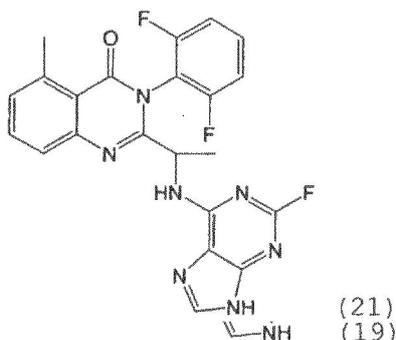
60

65

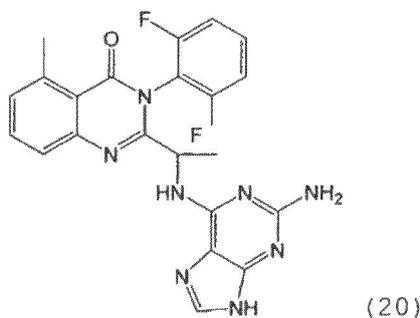


3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (19)

[0196] El compuesto 19 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se usó 2,6-difluorolanilina en lugar de anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  434.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 19 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(2,6-difluorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (20)

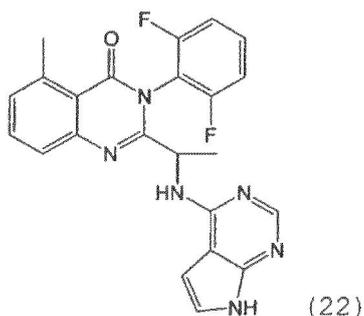
[0197] El Compuesto 20 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2,6-difluorolanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  449.5 ( $MH^+$ ). El Compuesto 20 se muestra abajo.

3-(2,6-difluoro-fenil)-2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (21)

[0198] El Compuesto 21 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2,6-difluorolanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 2-fluoro-6-cloropurina por 6-bromopurina en el paso D.  $^1H$ NMR (MeOH- $d_4$ ):  $\delta$  8.22-8.17 (m, 1H); 7.76-7.62 (m, 2H); 7.47-7.45 (m, 1 H); 7.38-7.33 (m, 1.2H); 7.30-7.17 (m, 1H); 6.88-6.75 (m, 1H); 5.30-5.27 (m, 0.5H); 5.09-5.07 (m, 0.5H); 2.778 (s, 3H); 1.62-1.50 (m, 3H). El Compuesto 21 se muestra abajo.

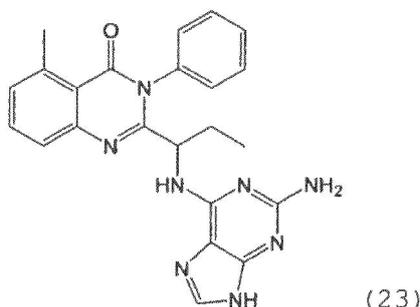
3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (22)

[0199] El Compuesto 22 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2,6-difluorolanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidine por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  433 ( $MH^+$ ). El Compuesto 22 se muestra abajo.



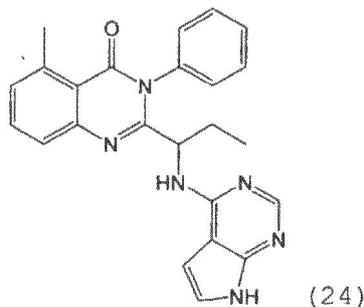
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-propil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (23)

15 **[0200]** El Compuesto 23 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 427 (M + H), 214. El Compuesto 23 se muestra abajo.



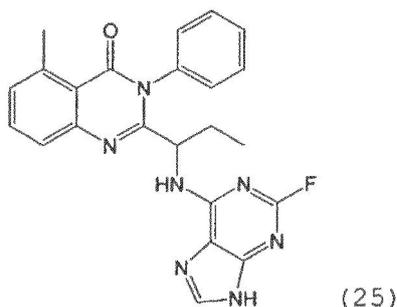
30 5-metil-3-fenil-2-[1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ylamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (24)

35 **[0201]** El compuesto 24 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 7-deaza-6-cloropurina por 6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 411 (M + H), 206. El Compuesto 24 se muestra abajo.



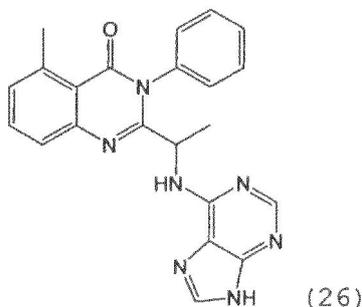
50 2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ylamino)-propil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (25)

55 **[0202]** El compuesto 25 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2-fluoro-6-cloropurina por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 430 (M + H), 446. El Compuesto 25 se muestra abajo.

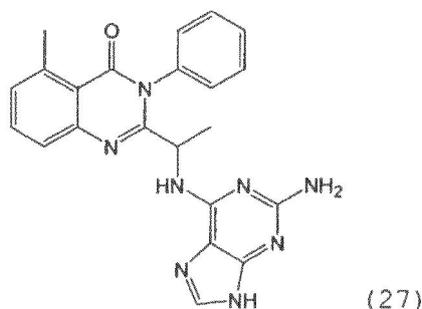


5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (26)

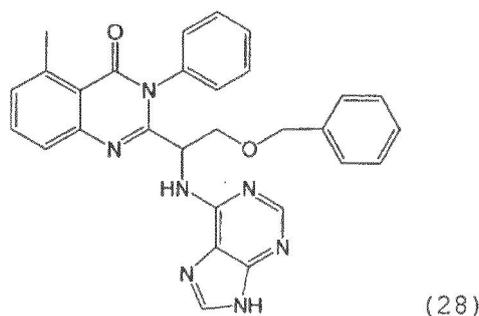
[0203] El Compuesto 26 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso (ES): m/z 398 (M + H). El Compuesto 26 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (27)

[0204] El compuesto 27 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS m/z 413.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 27 se muestra abajo.

2-[2-benziloxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenyl-3H-quinazolin-4-ona (28)

[0205] El compuesto 28 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 3-benziloxi-2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. MS (ES): m/z 504 (M + H), 396, 261. El Compuesto 28 se muestra abajo.



2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-2-benziloxi-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (29)

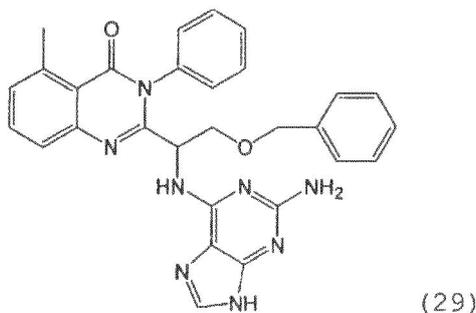
5 **[0206]** El Compuesto 29 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 3-benziloxi-2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster fue sustituido por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 519 (M + H), 411, 261. El Compuesto 29 se muestra abajo.

10

15

20

25

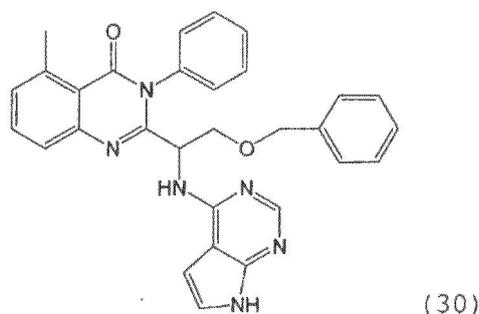
2-[2-benziloxi-1-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (30)

30 **[0207]** El Compuesto 30 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 3-benziloxi-2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster fue sustituido por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 4-cloro-7H-pirrol[2,3-d]pirimidina por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 503 (M + H), 395. El Compuesto 30 se muestra abajo.

35

40

45

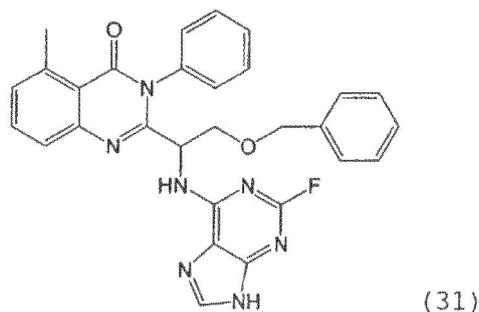
2-[2-benziloxi-1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (31)

50 **[0208]** El Compuesto 31 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 3-benziloxi-2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-fluoro-6-cloropurina por 5-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 522 (M + H), 414, 261. El Compuesto 31 se muestra abajo.

55

60

65



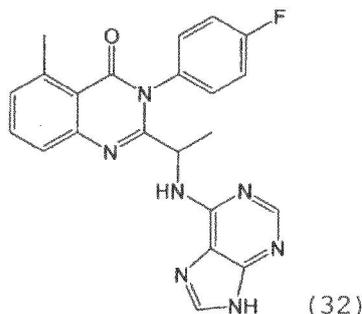
5 3-(4-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (32)

10 **[0209]** El compuesto 32 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero, con los siguientes cambios: 4-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS *m/z* 416.1(MH<sup>+</sup>). El Compuesto 32 se muestra abajo.

15

20

25

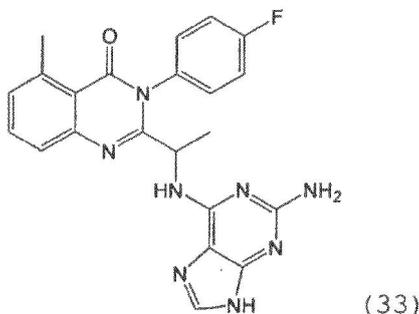
25 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(4-fluorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (33)

30 **[0210]** El compuesto 33 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 4-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS *m/z* 431.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 33 se muestra abajo.

35

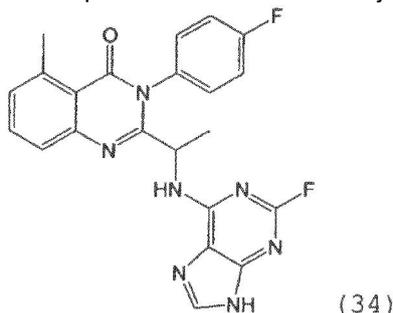
40

45

50 3-(4-fluoro-fenil)-2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (34)

55 **[0211]** El Compuesto 34 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 4-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C, y 2-fluoro-6-cloropurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS *m/z* 434.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 34 se muestra abajo.

60



5

10

3-(4-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (35)

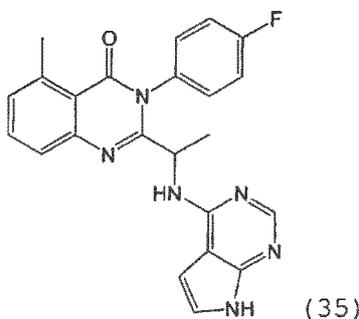
15

**[0212]** El Compuesto 35 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 4-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-7H-pirrol[2,3-d]pirimidine se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  415.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 35 se muestra abajo.

20

25

30

5-metil-3-fenil-2-[1-(7H-pirrol[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (36)

35

**[0213]** El Compuesto 36 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-7H-pirrol[2,3-d]pirimidine se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  397 ( $MH^+$ ). El Compuesto 36 se muestra abajo

40

3-(3-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (37)

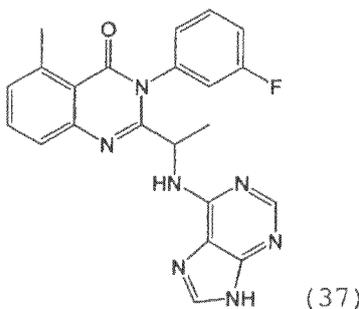
45

**[0214]** El Compuesto 37 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C.  $^1H$ NMR (dms $o$ - $d_6$ ): 8.30-8.28 (m, 2H); 7.70-7.49 (m, 3H); 7.44-7.3020 (m, 4H); 4.91-4.88 (m, 1H); 2.72-2.68 (m, 3h); 1.50-1.48 (m, 3H). El Compuesto 37 se muestra abajo.

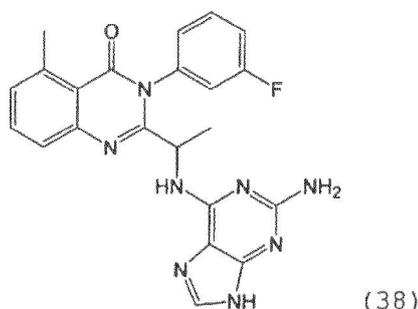
50

55

60

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-fluorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (38)

5

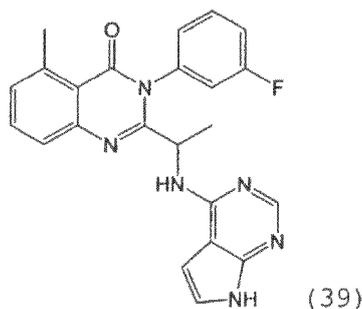


10

**[0215]** El Compuesto 38 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D.  $^1\text{H}$  NMR (dmsó-d<sub>6</sub>): 8.16-8.12 (m, 1H); 7.74-7.69 (m, 1H); 7.62-7.53 (m, 2H); 7.46-7.12 (m, 6H); 4.96 (bs, 1H); 4.0 2.74-2.67 (m, 3H); 1.47-1.45 (m, 3H). El Compuesto 38 se muestra abajo.

15

20



25

30

3-(3-fluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(7H-pirrololo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (39)

**[0216]** El Compuesto 39 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-7H-pirrololo[2,3-d]pirimidine se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  415.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 39 se muestra abajo

35

40

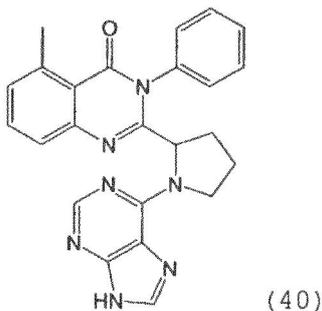
5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-il)-pirrolidin-2-il]-3H-quinazolin-4-ona (40)

**[0217]** El Compuesto 40 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido pirrolidín-1,2-dicarboxílico 2-(2,5-dioxo-pirrolidin-1-il)éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. MS (ES):  $m/z$  424 (M + H), 212. El Compuesto 40 se muestra abajo.

45

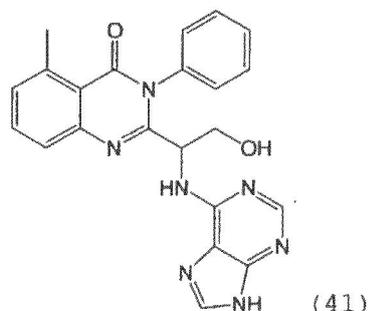
50

55

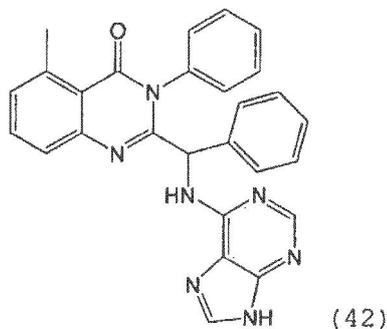


2-[2-hidroxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (41)

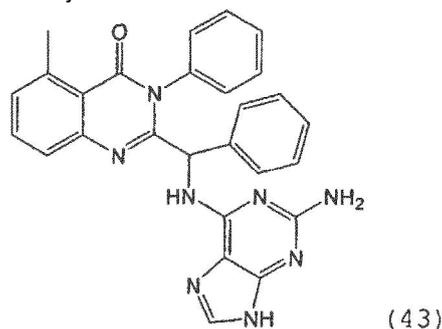
[0218] Una suspensión del compuesto 28 (60 mg, 0.097 mmol), Pd(OH)<sub>2</sub> (cat.) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso (0.5 mL) en etanol (2.5 mL) se hidrogenó a 45psi por 14 días. La mezcla se filtró para remover los solventes, y el filtrado resultante se purificó por HPLC para proporcionar el producto 41 como un sólido blanco. MS (ES): m/z 414 (M + H), 396, 261. El Compuesto 41 se muestra abajo.

5-metil-3-fenil-2-[fenil-(9H-purin-6-ilamino)-metil]-3H-quinazolin-4-ona (42)

[0219] El compuesto 42 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido tert-butoxicarbonilamino-fenil-acético 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso MS (ES): m/z 460 (M + H), 325. El Compuesto 42 se muestra abajo.

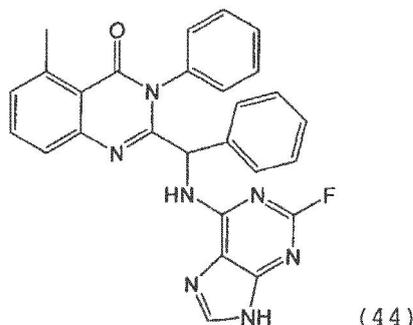
2-[(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-fenil-metil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (43)

[0220] El Compuesto 43 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido tert-butoxicarbonilamino-fenil-acético 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 475 (M + H). El Compuesto 43 se muestra abajo.

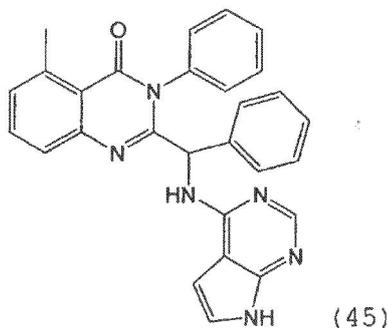


2-[(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-fenil-metil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (44)

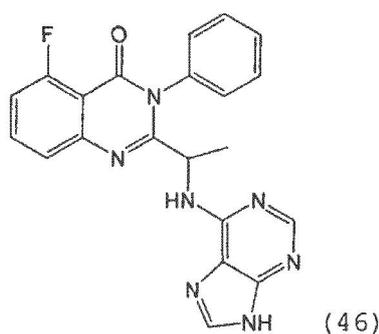
5 **[0221]** El Compuesto 44 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido tert-butoxicarbonilamino-fenil-acético 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-fluoro-6-cloropurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 478 (M + H), 325. El Compuesto 44 se muestra abajo.

5-metil-3-fenil-2-[fenil-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-metil]-3H-quinazolin-4-ona (45)

25 **[0222]** El Compuesto 45 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido tert-butoxicarbonilamino-fenil-acético 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidine se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES): m/z 459 (M + H), 230. El Compuesto 45 se muestra

5-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (46)

50 **[0223]** El Compuesto 46 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-6-fluoro-benzoico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS m/z 402.3 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 46 se muestra abajo.



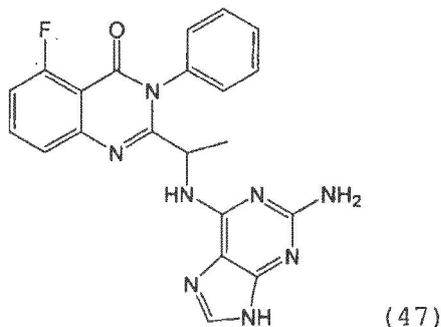
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-fluoro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (47).

5 **[0224]** El Compuesto 47 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-6-fluoro-benzoico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  417.2 ( $MH^+$ ). El Compuesto 47 se muestra

10

15

20

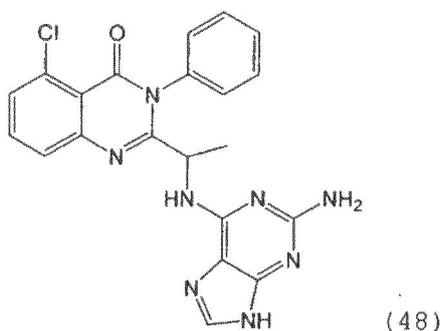
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-cloro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (48)

25 **[0225]** El compuesto 48 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero ácido 2-amino-6-clorobenzoico se sustituyó por ácido 2-amino-6-metilbenzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES):  $m/z$  433 ( $M + H$ ), 177. El Compuesto 48 se muestra

30

35

40

[éster bencil de ácido [5-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)-5-(9H-purin-6-ilamino)-pentil]-carbámico (49)

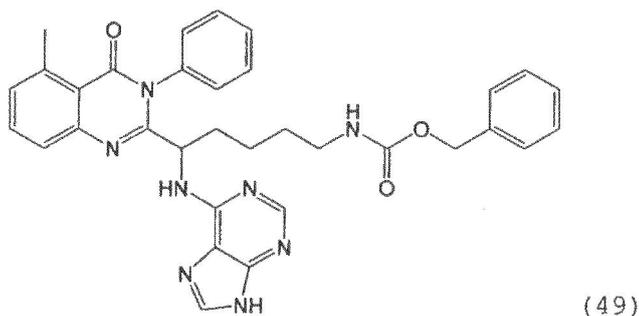
45 **[0226]** El Compuesto 49 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 6-benziloxicarbonilamino-2-tert-butoxicarbonilaminohexanoico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se usó el procedimiento

50

55

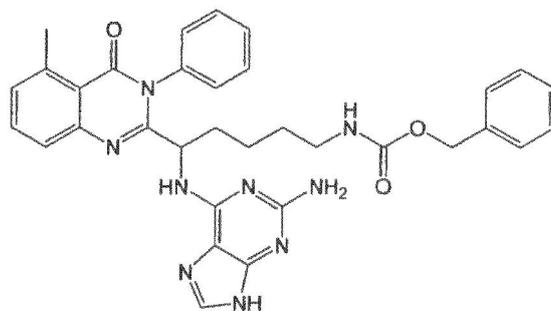
60

65



ácido [5-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-5-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-pentil-carbámico bencil éster(50)

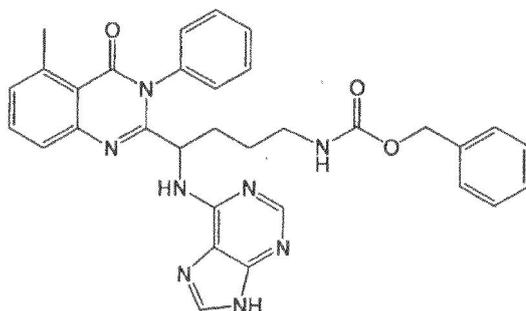
[0227] El Compuesto 50 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 6-benziloxicarbonilamino-2-*tert*-butoxicarbonilamino-hexanoico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  604 ( $MH^+$ ). El Compuesto 50 se muestra abajo.



(50)

éster bencil de ácido [4-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)-4-(9H-purin-6-ilamino)-butil]-carbámico (51)

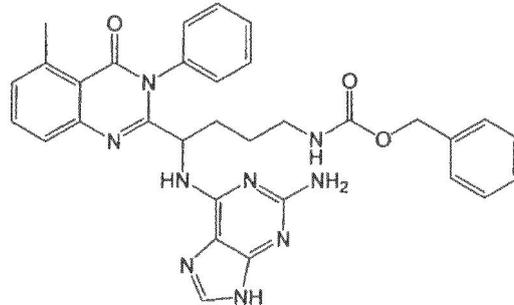
[0228] El compuesto 51 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 6-benziloxi-2-*tert*-butoxicarbonilaminopentanoico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  575 ( $MH^+$ ). El Compuesto 51 se muestra abajo.



(51)

bencil éster ácido [4-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-4-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-butil]-carbámico (52)

[0229] El compuesto 52 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero ácido 6-benziloxicarbonilamino-2-*tert*-butoxicarbonilamino-pentanoico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  590 ( $MH^+$ ). El Compuesto 52 se muestra abajo.

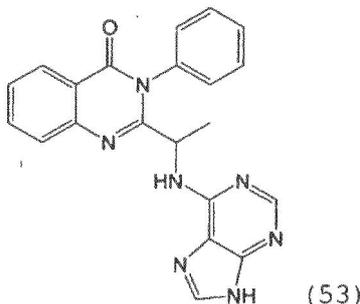


(52)

3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-inazolin-4-ona (53)

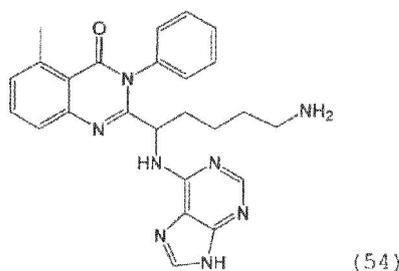
[0230] El compuesto 53 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero ácido antranílico se sustituyó por 2-amino-6-metilbenzoico en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el

paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. MS (ES):  $m/z$  384.1 (M + H). El Compuesto 53 se muestra abajo.



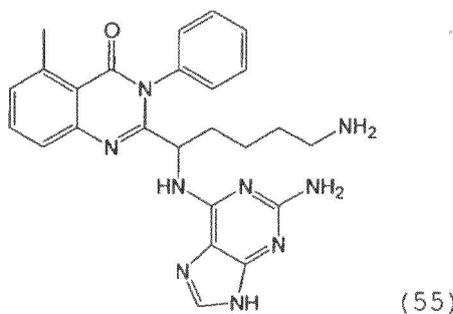
2-[5-amino-1-(9H-purin-6-ylamino)-pentil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (54)

**[0231]** Una mezcla del compuesto 49 (28.5 mg) y paladio sobre carbono (10 mg, 10% Pd) en etanol (2 mL) se agitó con hidrógeno (40 psi) por 48 h. La mezcla se filtró a través de CELITE® y el filtrado se concentró para lograr el producto 54. ESI-MS  $m/z$  = 455 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 54 se muestra abajo.



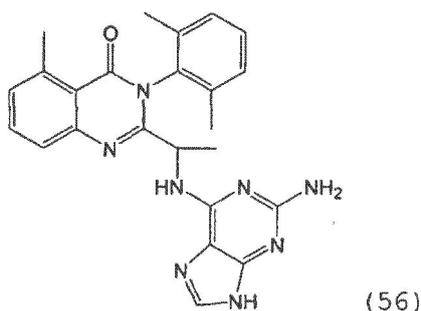
2-[5-amino-1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-pentil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (55)

**[0232]** El compuesto 55 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 54, pero el compuesto 50 fue sustituido por el compuesto 49. ESI-MS  $m/z$  = 470 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 55 se muestra abajo.



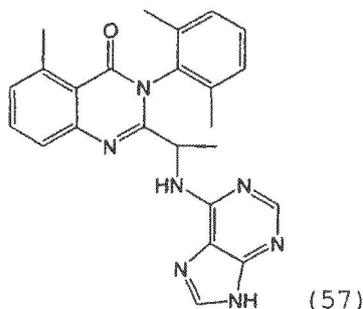
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-3-(2,6-dimetil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (56)

**[0233]** El compuesto 56 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 2,6-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  441 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 56 se muestra abajo.

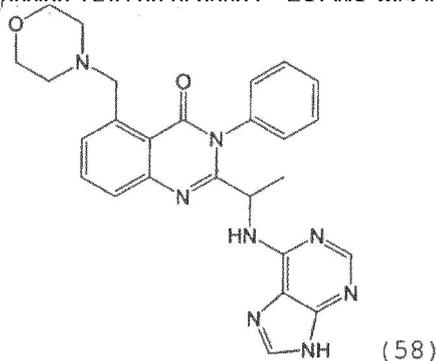


3-(2,6-dimetil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (57)

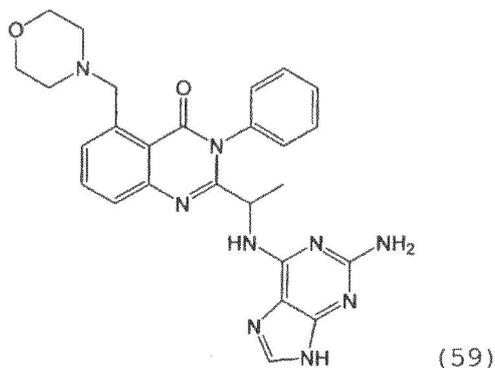
[0234] El compuesto 57 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 2,6-dimetilanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  426 ( $MH^+$ ). El Compuesto 57 se muestra abajo.

5-morfolin-4-ilmetil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (58)

[0235] El Compuesto 58 se preparó usando los pasos B, C y D del procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el compuesto intermedio 2 se sustituyó por el producto del paso A en el paso B (así no se necesitó el paso A), el ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B se sustituyó por el ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  493 ( $MH^+$ ). El Compuesto 58 se muestra abajo.

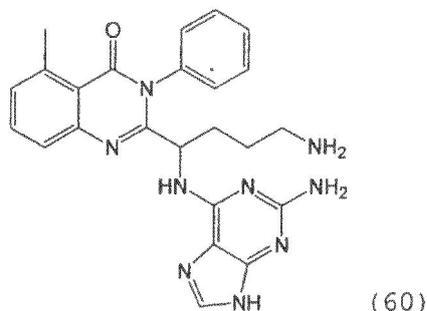
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-morfolin-4-ilmetil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (59)

[0236] El Compuesto 59 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 58, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  498 ( $MH^+$ ). El Compuesto 59 se muestra abajo.

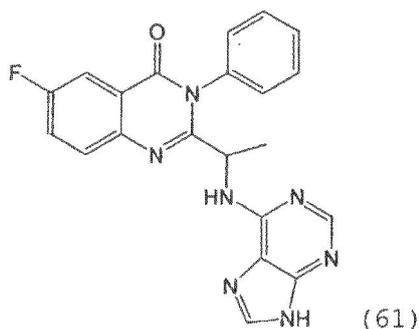


2-[4-amino-1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-butil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (60)

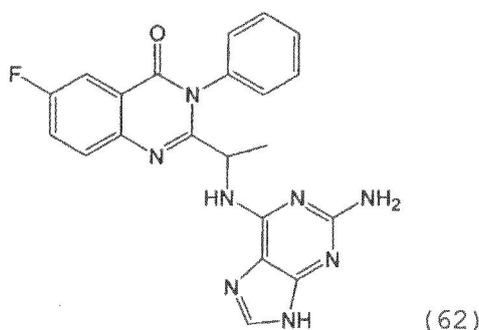
[0237] El compuesto 60 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 54, pero el compuesto 52 fue sustituido por el compuesto 49. ESI-MS  $m/z$  456 ( $MS^+$ ). El Compuesto 60 se muestra abajo.

6-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (61)

[0238] El Compuesto 61 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-5-fluoro-benzoico por ácido 2-amino-5-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tertibutoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso C, y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  402 ( $MH^+$ ). El Compuesto 61 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-6-fluoro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (62)

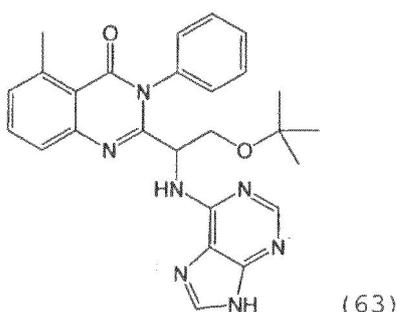
[0239] El Compuesto 62 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 61, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  417 ( $MH^+$ ). El Compuesto 62 se muestra abajo.

2-[2-tert-butoxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (63)

[0240] El Compuesto 63 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-benziloxi-3-tertibutoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B. MS (ES):  $m/z$  470 ( $M + H$ ), 396, 261. El Compuesto 63 se muestra abajo.

5

10



15

3-(3-metil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (64)

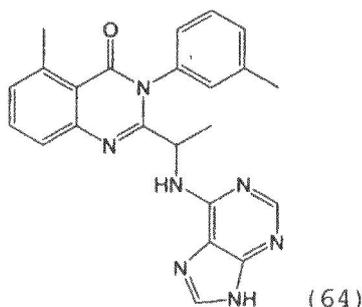
20

**[0241]** El compuesto 64 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero *m*-toluidina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. <sup>1</sup>H NMR (dmso-d<sub>6</sub>): 8.41-8.36 (m, 2H); 7.71-7.66 (m, 1H); 7.53-7.51 (m, 5H); 4.97 (m, 1H); 2.72 (s, 3H); 2.39 (s, 1.5H); 2.09 (s, 1.5H); 1.50-1.48 (m, 3H). El Compuesto 64 se muestra abajo.

25

30

35



2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-metil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (65)

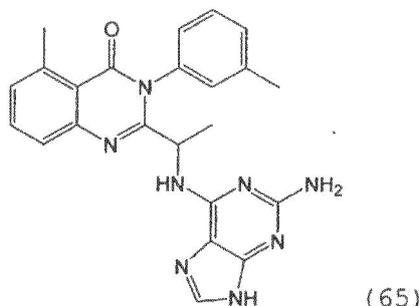
40

45

**[0242]** El Compuesto 65 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó *m*-toluidina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. <sup>1</sup>H NMR (dmso): 8.94-8.92 (m, 1H); 8.18 (s, 1H); 7.75-7.68 (m, 1H); 7.58-7.51 (m, 1H); 5.07-4.96 (m, 1H); 2.79-2.73 (m, 3H); 2.40 (s, 1.5H); 1.91 (s, 1.5H); 1.48-1.43 (m, 3H). El Compuesto 65 se muestra abajo.

50

55



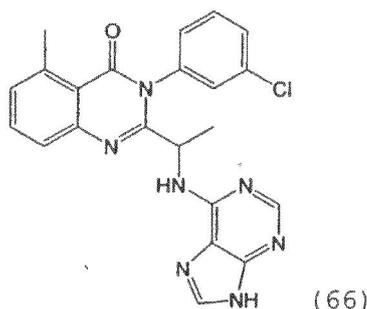
60

3-(3-cloro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (66)

65

**[0243]** El compuesto 66 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3-cloroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. <sup>1</sup>H NMR (dmso-d<sub>6</sub>): 8.40-8.31 (m, 2H); 7.73-7.66 (m, 1H); 7.55-7.32 (m, 6H); 5.04-4.86 (m, 1H); 2.72 (s, 3H); 1.52-1.50 (m, 3H). El Compuesto 66 se muestra abajo.

5



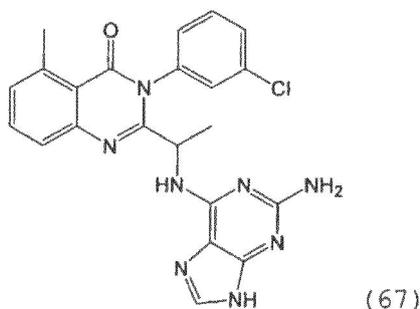
10

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-3-(3-clorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (67)

15

**[0244]** El Compuesto 67 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 66, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  447.2 ( $MH^+$ ). El Compuesto 67 se muestra abajo.

20



25

30

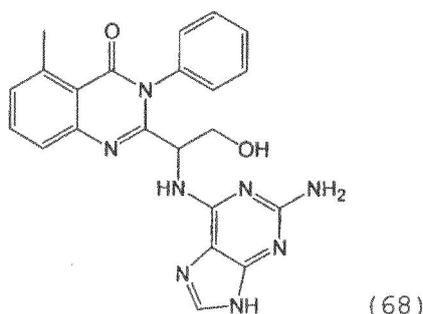
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-2-hidroxi-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (68)

35

**[0245]** El Compuesto 68 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-benziloxi-3-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. la 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-2-*tert*-butoxi-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona obtenida se disolvió luego en ácido trifluoroacético y se le permitió agitar a temperatura ambiente por 5 horas. La purificación por LC proporcionó el producto 68 como un sólido blanco. MS (ES):  $m/z$  429 ( $M + H$ ), 215, 206, 151. El Compuesto 68 se muestra abajo.

40

45



50

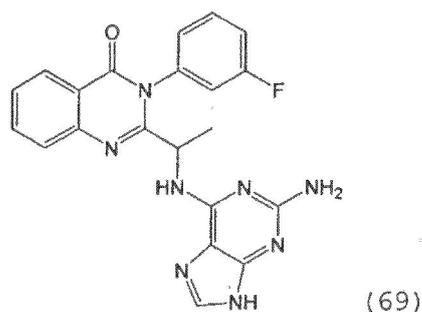
55

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-3-(3-fluoro-3-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (69)

60

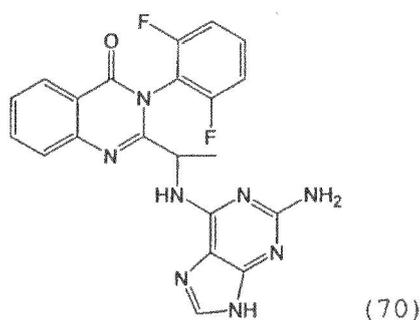
**[0246]** El Compuesto 69 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  417.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 69 se muestra abajo.

65



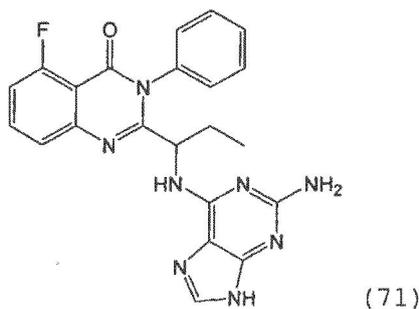
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-3-(2,6-difluoro-3-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (70)

**[0247]** El compuesto 70 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 2,6-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS *m/z*. 435.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 70 se muestra abajo.



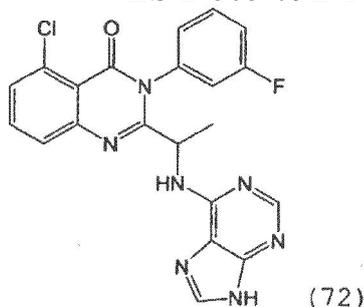
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-propil]-5-fluoro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (71)

**[0248]** El compuesto 71 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-5-fluorobenzoico por ácido 2-amino-5-metilbenzoico en el paso A, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS *m/z* 431 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 71 se muestra abajo.



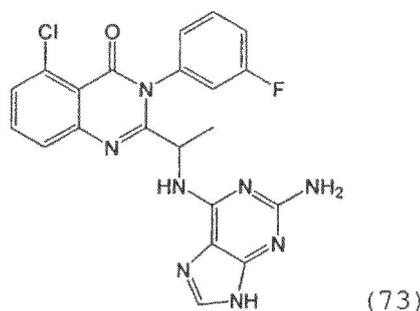
5-cloro-3-(3-fluoro-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-9-ona (72)

**[0249]** El compuesto 72 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero ácido 2-amino-6-clorobenzoico se sustituyó por ácido 2-amino-6-metilbenzoico y 3-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS *m/z* 436.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 72 se muestra abajo.



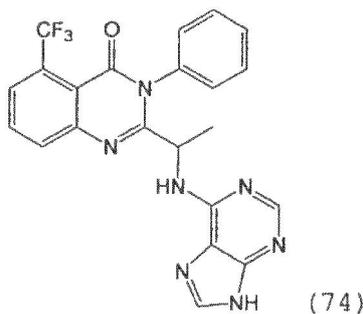
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-5-cloro-3-(3-fluoro-3-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (73)

5  
10 **[0250]** El Compuesto 73 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-6-clorobenzoico por 2-amino-6-metilbenzoico y 3-fluoroanilina fue sustituida por anilina en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  451.1 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 73 se muestra abajo.



3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-5-trifluorometil-3H-quinazolin-4-ona (74)

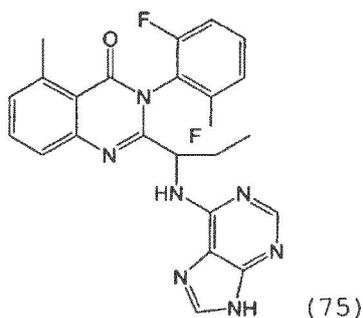
20  
25  
30  
35 **[0251]** El Compuesto 74 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se usó 2-amino-N-fenil-6-trifluorometil-benzamida en lugar del compuesto 15 en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA). (ES):  $m/z$  452 (M + H). El Compuesto 74 se muestra abajo.



40  
45  
50  
55 **[0252]** Se preparó 2-amino-N-fenil-6-trifluorometil-benzamida con la adición de anilina (1.0 eq.) a una suspensión de trihidrato de ácido 2-amino-6-(trifluorometil)-benzoico (1.0 g, 4.0 mmol, 1.3 eq-) y polistireno-carbodiimida (3.6 g, 1.1-1.7 eq.) en THF (40 mL). La mezcla se revolvió a temperatura ambiente por 18 horas, luego se filtró. El filtrado se concentró *in vacuo* y se purificó por cromatografía flash para proporcionar 2-amino-N-fenil-6-trifluorometil-benzamida como un sólido amarillo.

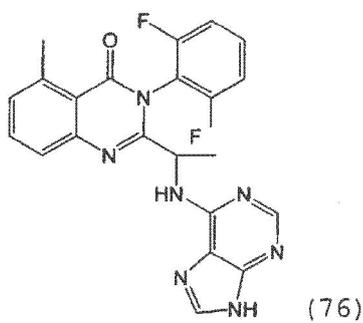
60 3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (75)

65 **[0253]** El Compuesto 75 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2,6-difluoroanilina por anilina en el paso A. ESI-MS  $m/z$  448 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 75 se muestra abajo.



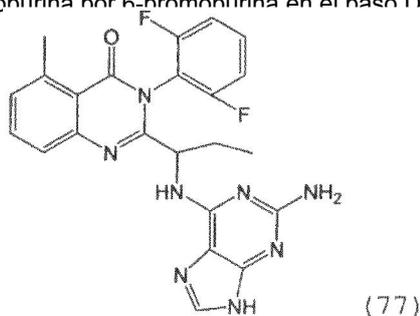
15 3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (76)

20 **[0254]** El Compuesto 76 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2,6-difluoroanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  434.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 76 se muestra abajo.



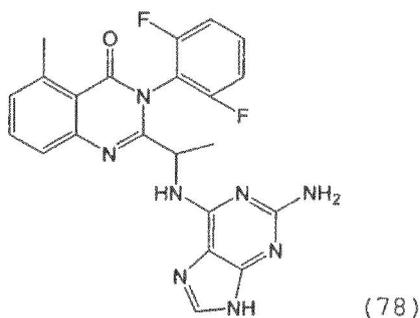
35 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-3-(2,6-difluoro-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (77)

40 **[0255]** El Compuesto 77 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 75, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  463 ( $MH^+$ ). El Compuesto 77 se muestra abajo



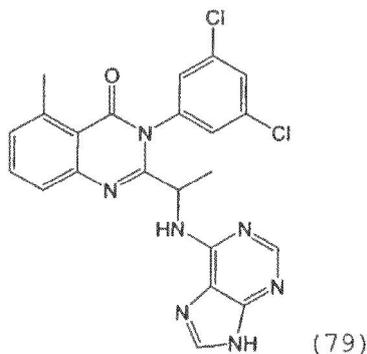
55 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(2,6-difluorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (78)

60 **[0256]** El Compuesto 78 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 76, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  449 ( $MH^+$ ). El Compuesto 78 se muestra abajo.

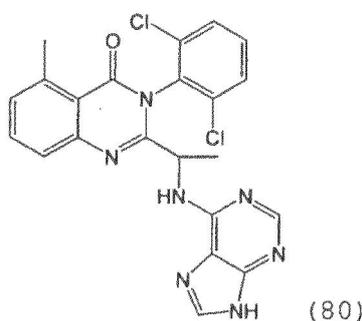


**3-(3,5-dicloro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (79)**

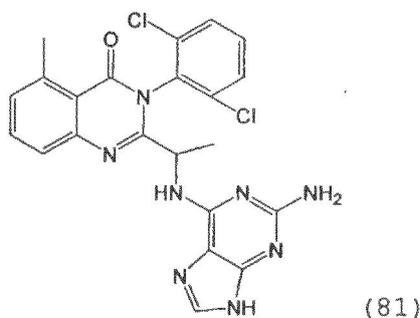
5 **[0257]** El Compuesto 79 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 3,5-dicloroanilina se sustituyó por anilina en el paso 1, y se sustituyó ácido 2-tert-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  467 ( $MH^+$ ). El Compuesto 79 se muestra abajo.

**3-(2,6-dicloro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (80)**

25 **[0258]** El Compuesto 80 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero 2,6-dicloroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, y se sustituyó ácido 2-tert-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  467 ( $MH^+$ ). El Compuesto 80 se muestra abajo.

**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(2,6-diclorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (81)**

45 **[0259]** El Compuesto 81 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 80, pero se sustituyó ácido 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  482 ( $MH^+$ ). El Compuesto 81 se muestra abajo.

**5-cloro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (82)**

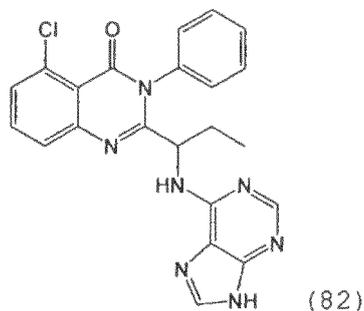
65 **[0260]** El Compuesto 82 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-6-cloro-benzoico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-

pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  432 ( $MH^+$ ). El Compuesto 82 se muestra abajo.

5

10

15



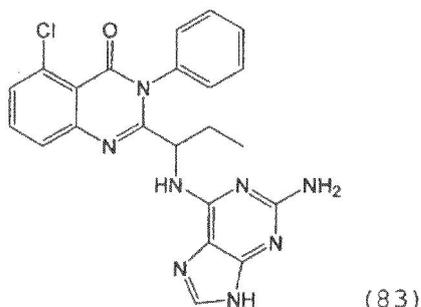
2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-propil]-5-cloro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (83)

20 **[0261]** El Compuesto 83 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  447 ( $MH^+$ ). El Compuesto 83 se muestra abajo.

25

30

35

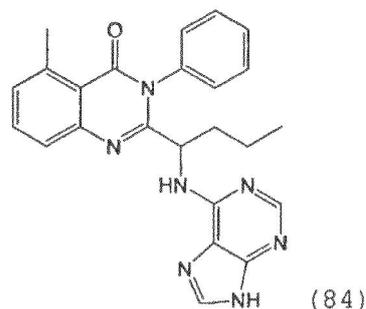


5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-butil]-3H-quinazolin-4-ona (84)

40 **[0262]** El compuesto 84 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 2-tert-butoxicarbonilaminopentanoico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B. MS (ES):  $m/z$  426 ( $M + H$ ), 213. El Compuesto 84 se muestra abajo.

45

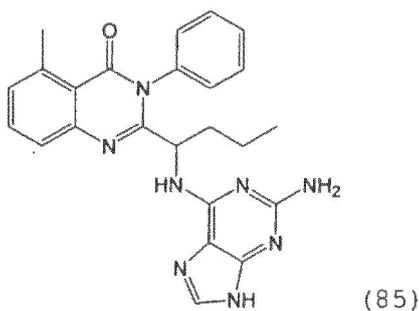
50



55 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-butil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (85)

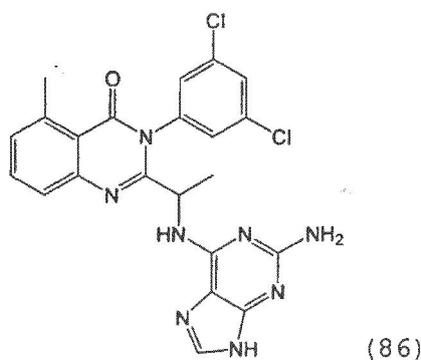
60 **[0263]** El Compuesto 85 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-tert-butoxicarbonilaminopentanoico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. MS (ES):  $m/z$  441 ( $M + H$ ), 221. El Compuesto 85 se muestra abajo.

65



15 **2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-3-(3,5-diclorofenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (86)**

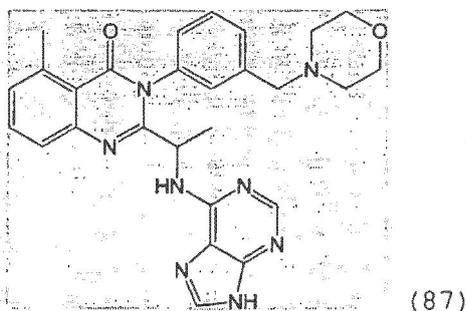
[0264] El compuesto 86 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se usó 2-fluoro-6-bromopurina en lugar de 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  482 ( $MH^+$ ). El Compuesto 86 se muestra abajo.



35

**5-metil-3-(3-morfolin-4-ilmetil-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (87)**

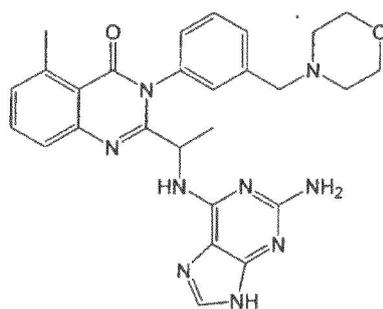
40 [0265] El Compuesto 87 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el compuesto intermedio 8 se sustituyó por anilina en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  497 ( $MH^+$ ). El Compuesto 87 se muestra abajo.



60

**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)-etil]-5-metil-3-(3-morfolin-4-ilmetil-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (88)**

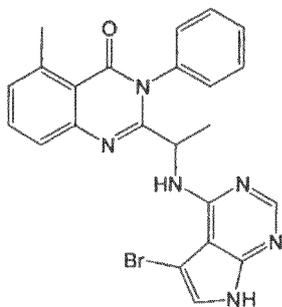
65 [0266] El Compuesto 88 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 87, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  498 ( $MH^+$ ). El Compuesto 88 se muestra abajo.



(88)

**2-[1-(5-bromo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (89)**

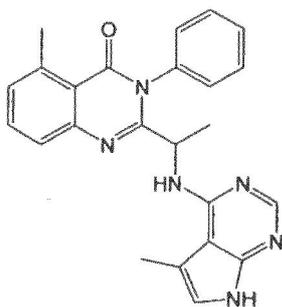
**[0267]** El compuesto 89 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico: 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-5-bromo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (preparada como en J. Med. Chem. 1988, 31, 2086-2092) se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  411.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 89 se muestra abajo.



(89)

**5-metil-2-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (90)**

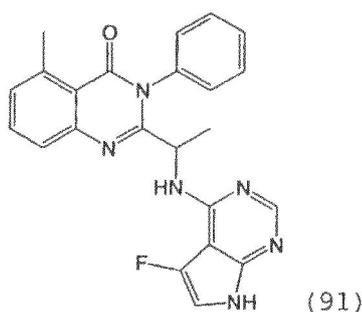
**[0268]** El Compuesto 90 se preparó usando el procedimiento general descrito con respecto al compuesto 14, pero ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster se sustituyó por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y 4-cloro-5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (preparada como en J. Med. Chem. 1990, 33, 1984-1992) se sustituyó por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  411.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 90 se muestra abajo.



(90)

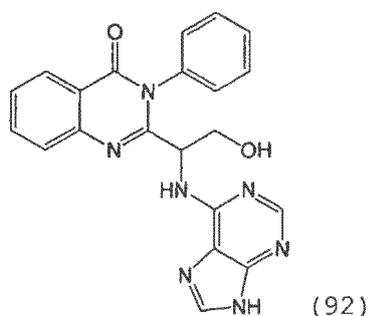
**2-[1-(5-fluoro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilamino)-etil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (91)**

**[0269]** El Compuesto 91 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster fue sustituido por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C, y se sustituyó el compuesto intermedio 1 por 6-bromopurina. ESI-MS  $m/z$  = 415.1 ( $MH^+$ ). El Compuesto 91 se muestra abajo.



15 2-[2-hidroxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (92)

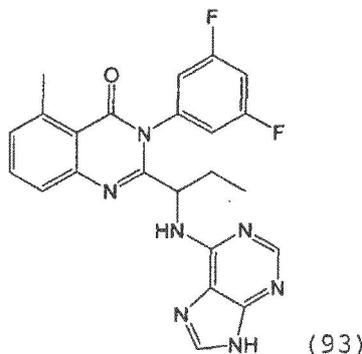
20 **[0270]** El Compuesto 92 se preparó agregando ácido trifluoroacético a una solución de 2-[2-*tert*-butoxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona en diclorometano. La mezcla se revolvió a temperatura ambiente por 18 horas, luego se concentró *in vacuo*. La purificación por LC proporcionó el producto como un sólido blanco. MS (ES):  $m/z$  400 (M + H), 382, 200, 136. El Compuesto 92 se muestra abajo.



35 **[0271]** 2-[2-*tert*-butoxi-1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14 pero el ácido 2-amino-6-clorobenzoico se sustituyó por 2-amino-6-metilbenzoico en el paso A, ácido 2-benciloxicarbonilamino-3-*tert*-butoxi-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por ácido 2-benciloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y las condiciones usadas en el paso C removieron el grupo protector bencil y el sustituyente cloro del anillo A.

40 3-(3,5-difluoro-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (93)

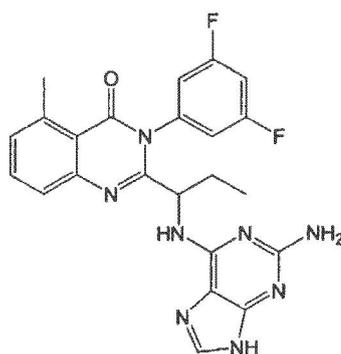
45 **[0272]** El Compuesto 93 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 3,5-difluoroanilina por anilina en el paso A. ESI-MS  $m/z$  448 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 93 se muestra abajo.



60 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-3-(3,5-difluoro-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (94)

65 **[0273]** El compuesto 94 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 90, pero se usó 2-amino-6-bromopurina en lugar de 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  463 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 94 se muestra abajo.

5



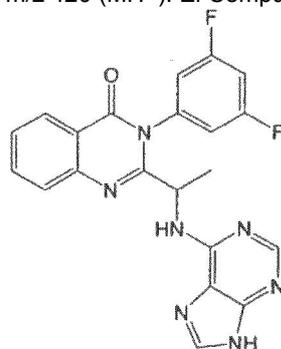
(94)

10 3-(3,5-difluoro-phenyl)-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (95)

15

**[0274]** El compuesto 95 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero el ácido antranílico se sustituyó por 2-amino-6-metilbenzoico y 3,5-fluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, se sustituyó ácido 2-*tert*-butoxicarbonilaminopropiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxopirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  420 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 95 se muestra abajo.

20



(95)

25

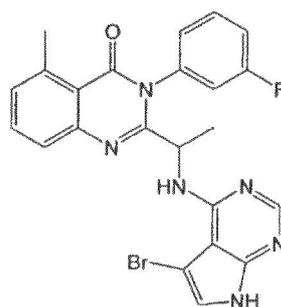
30

2-[1-(5-bromo-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ylamino)-etil]-3-metil-3-(3-fluoro-phenil)-5-metil--3H-quinazolin-4-ona (96)

35

**[0275]** El Compuesto 96 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 3-fluoroanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  494 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 96 se muestra abajo.

40



(96)

45

50

3-(3-fluoro-phenil)-5-metil-2-[1-(5-metil-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (97)

55

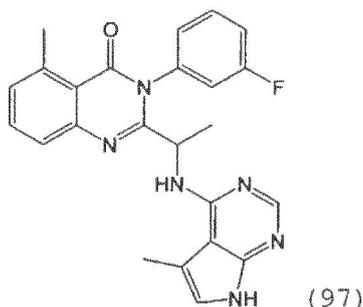
**[0276]** El Compuesto 97 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó 3-fluoroanilina por anilina en el paso A, ácido 2-*tert*-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster en el paso B, y se usó el procedimiento alternativo (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  429 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 97 se muestra abajo.

60

5

10

15



**3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (98)**

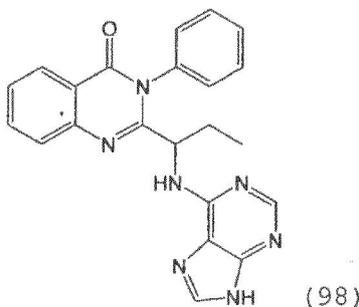
20

**[0277]** El Compuesto 98 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido antranílico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A. MS (ES):  $m/z$  398 (M + H), 199. El Compuesto 98 se muestra abajo

25

30

35



**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3,5-difluoro-3-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (99)**

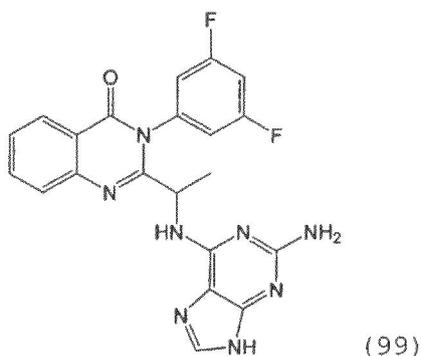
40

**[0278]** El Compuesto 99 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 95, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  435 (MH<sup>+</sup>). El Compuesto 96 se muestra abajo.

45

50

55

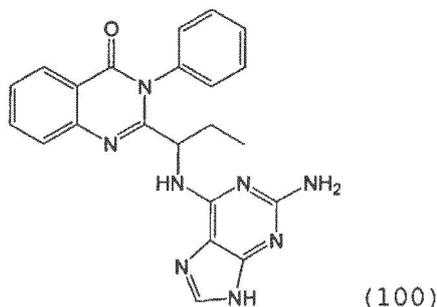


**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (100)**

60

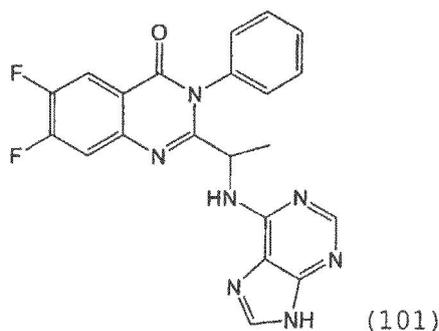
**[0279]** El compuesto 100 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido antranílico por ácido 2-amino-6-metilbenzoico en el paso A, y se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  413 (MH<sup>+</sup>), 207. El Compuesto 100 se muestra abajo.

65

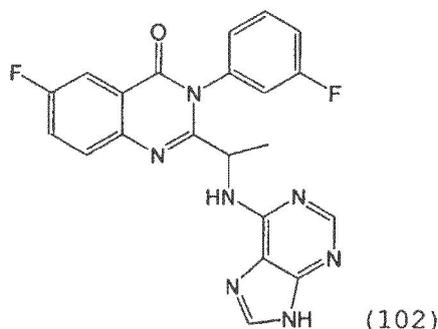


**6.7-difluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (101)**

[0280] El Compuesto 101 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-4,5-difluoro-benzoico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxopirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster en el paso B y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  420 ( $MH^+$ ). El Compuesto 101 se muestra abajo.

**6-fluoro-3-(3-fluoro-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (102)**

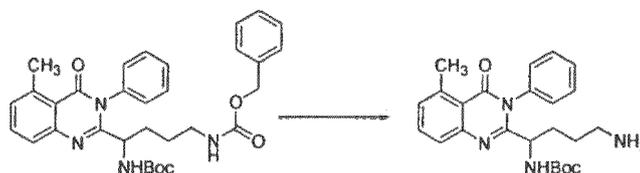
[0281] El Compuesto 102 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 14, pero se sustituyó ácido 2-amino-5-fluoro-benzoico por ácido 2-amino-6-metil-benzoico en el paso A, ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster por ácido 2-benziloxicarbonilaminobutírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il-éster en el paso B, y se usó el procedimiento alterno (deprotección TFA) en el paso C. ESI-MS  $m/z$  420 ( $MH^+$ ). El Compuesto 102 se muestra abajo.

**2-[4-dietilamino-1-(9H-purin-6-ilamino)-butil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-one(103)**

[0282] El Compuesto 103 se preparó siguiendo los pasos A-D más adelante.

**éster tert-butil de ácido [4-amino-1-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)butil]-carbámico (104)**

[0283] Paso A: Se purgó un matraz de fondo redondo, un cuello de 10 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con 10% paladio sobre carbono (30 mg, 50% húmedo). Una solución de ácido [4-benziloxicarbonilamino-1-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidro-quinazolin-2-il)-butil]-carbámico tert-butil éster (producto del paso B del procedimiento para el compuesto 51) (100 mg, 0.18 mmol) en etanol (2 mL) y polimetilhidrosiloxana (130 mg) se agregaron secuencialmente. La mezcla de la reacción se agitó a 50 °C por 3 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla se filtró a través de un lecho de CELITE® y el filtrado se evaporó hasta la sequedad. La purificación posterior del producto crudo resultante por cromatografía en columna produjo un rendimiento del 62% del compuesto 101 como un sólido blanco.  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  7.55-7.69 (m, 5H), 7.33-7.49 (m, 2H), 7.30 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 4.29 (m, 1H), 2.77 (s, 3H), 2.38-2.47 (m, 2H), 1.72-1.88 (m, 1H), 1.57-1.79 (m, 1H), 1.13-1.55 (m, 4H), 1.40 (s, 9H). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 104 se muestran a continuación.



Éster tert-butil de ácido [4-dietilamino-1-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)-butil]-carbámico (105)

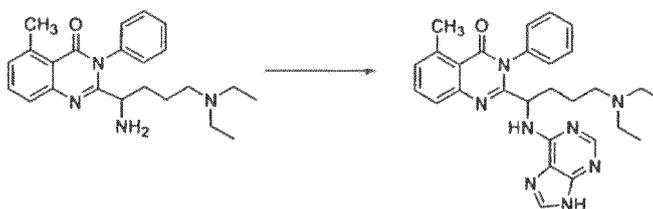
5  
**[0284]** Paso B: Se purgó un matraz de fondo redondo de un cuello de 10 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno, y luego se cargó con el compuesto 104 (100 mg, 0.24 mmol) y 1,2-dicloroetano (2 mL). Posteriormente se añadió acetaldehído (42 mg, 0.85 mmol) y triacetoborohidruro de sodio (400 mg, 1.90 mmol). La mezcla de la reacción se agitó por 18 h a temperatura ambiente, se evaporó a sequedad y el residuo resultante se disolvió en metanol (20 mL). Esta solución metanólica se trató con 10% paladio sobre carbono (5 mg, 50% húmedo), se agitó por 30 min, se evaporó a sequedad y se partió entre 10% carbonato de potasio acuoso (20 mL) y cloruro de metileno (20 mL). La capa orgánica se separó y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración de la capa orgánica seguida por concentración dio el compuesto 105 como un aceite amarillo, el cual se usó sin purificación. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.51-7.63 (m, 5H), 7.41 (d, 1H, J = 7.4 Hz), 7.29 (d, 1H, J = 7.15 Hz), 7.22 (d, 1H, J = 7.1 Hz), 6.10 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 4.38-4.52 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 2.32-2.50 (m, 4H), 2.08-2.27 (m, 2H), 1.47-1.73 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.25-1.38 (m, 1H), 0.96 (t, 6H, J = 7.2 Hz); ESI-MS *m/z* = 479 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 105 se muestran a continuación.

2-(1-amino-4-dietilamino-butil)-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (106)

25  
**[0285]** El procedimiento de deprotección alternativa descrito antes con respecto a la preparación del compuesto 14 (y específicamente la preparación del compuesto 17) se usó para deproteger el compuesto 105. La reacción y el compuesto 106 se muestran a continuación.

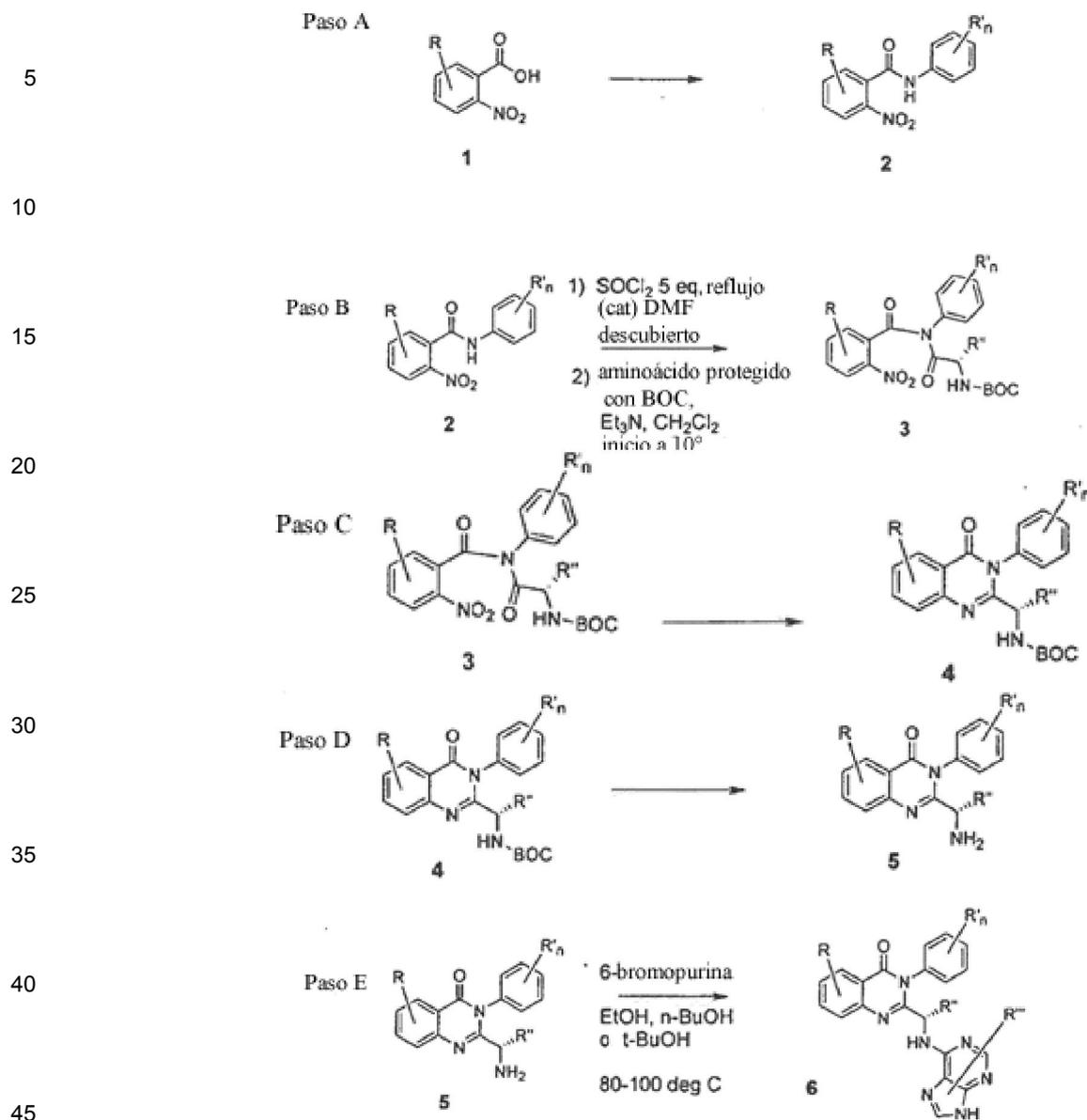
2-[4-dietilamino-1-(9H-purin-6-ilamino)-butil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin--4-ona (103)

35  
**[0286]** El compuesto 103 se preparó siguiendo el procedimiento general proporcionado antes en el paso D del procedimiento para el compuesto 14, pero se usó el compuesto 106 como la amina libre. ESI-MS *m/z* = 497 (MH<sup>+</sup>). La reacción y el compuesto 103 se muestran a continuación.

EJEMPLO 9PREPARACIÓN DEL COMPUESTO

55  
**[0287]** Los compuestos de acuerdo con la fórmula general I (mostrados antes), incluyendo los compuestos quirales que tienen la fórmula general II (mostrados antes), se han preparado de acuerdo con los pasos A-E del esquema sintético mostrado a continuación.

60



(S)-5-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (107)

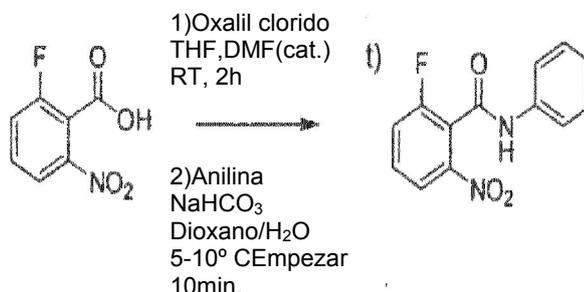
50 [0288] La síntesis de un compuesto de acuerdo con la fórmula I es ejemplificada primero usando los pasos A-E a continuación, los cuales proporcionan un procedimiento sintético para el compuesto 107, cuya estructura se muestra a continuación.



60 2-fluoro-6-nitro-N-fenil-benzamida (108)

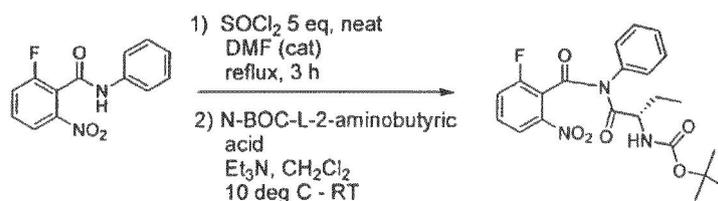
65 [0289] Paso A: Una solución de ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico (100 g, 0.504 mol) y dimetilformamida (5 mL) en diclorometano (600 mL) se trató gota a gota con cloruro de oxalilo (2 M en diclorometano, 410 mL, 0.8 mol, 1.5 eq.) por 30 min. Luego de agitar 2 h a temperatura ambiente, la reacción se concentró a un jarabe naranja con algunos sólidos presentes. El jarabe se disolvió en dioxano seco (80 mL) y se agregó lentamente a una suspensión de anilina (49 mL, 0.54 mol, 1 eq) y bicarbonato de sodio (90 g, 1.08 mol, 2 eq) en una mezcla de dioxano (250 mL) y agua (250 mL) a  $6^\circ\text{C}$ . La temperatura alcanzó  $27^\circ\text{C}$  al final de la adición. Luego de 30 min, la mezcla de la reacción se

trató con agua (1.2 L). El precipitado se recolectó por filtración en vacío, se enjuagó con agua (300 mL) se secó con aire en el embudo, y se secó in vacuo a 50°C por 24 h para lograr un producto sólido blanquecino (139 g, 99%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.82 (s, 1H), 8.12 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.91-7.77 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.15 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), ESI-MS *m/z* 261 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 108 se muestran a continuación.



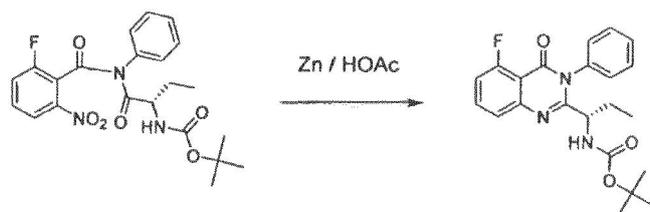
tert-butil éster de ácido (S)-[1-(2-fluoro-6-nitro-benzoil)-fenil-aminocarbonil]-propil-carbámico (109)

**[0290]** Paso B: Una suspensión del compuesto 108 (0.5 mol) y dimetilformamida (5 mL) en cloruro de tionilo (256 mL, 2.5 mol, 5 eq) se agitó a 85°C por 5 horas. La mezcla de la reacción se concentró in vacuo a un jarabe marrón. El jarabe se disolvió en diclorometano (200 mL) y se agregó lentamente a una solución de ácido N-BOC-L-2aminobutírico. (112 g, 0.55 mol, 1.1 eq) y trietilamina (77 mL, 0.55 mol, 1.1 eq) en diclorometano (600 mL) a 10°C. Luego de agitar a temperatura ambiente por 3 h, las sales se removieron por filtración, y la solución se enjuagó con 100 mL de agua, bicarbonato de sodio saturado, agua, 5% ácido cítrico y cloruro de sodio saturado. La fase orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró a un jarabe rojo. El jarabe se disolvió en diclorometano (450 mL) y se purificó por cromatografía flash sobre un tapón de gel de sílice (15 x 22 cm, 4L sílice seco) eluido con hexanos/aceto de etilo (10%, 8 L; 15%, 8 L; 20%, 8 L; 25%, 4 L) para rendir el compuesto 109 como un sólido blanquecino (147 g, 66%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.84 (t, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.78-7.67 (m, 1H), 7.65-7.49 (m, 3H), 7.40-7.28 (m, 2H), 7.19 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 4.05 (broad s, 1H), 1.75-1.30 (m, 2H), 1.34 (s, 9H), 0.93 (broad s, 3H). ESI-MS *m/z* = 446.3 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 109 se muestran a continuación.



éster tert-butil de ácido (S)-[1-(5-fluoro-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)propil]-carbámico (110)

**[0291]** Paso C: Una solución del compuesto 109 (125 mmol, 1 eq) en ácido acético (500 mL) se trató con polvo de zinc (48,4 g, 740 mmol, 6 eq) agregado en tres porciones, y la mezcla de la reacción se dejó enfriar por debajo de 35°C entre las adiciones. Luego de agitar a temperatura ambiente por 2 h, los sólidos fueron filtrados por filtración al vacío y se enjuagaron con ácido acético (50 mL). El filtrado se concentró in vacuo, se disolvió en EtOAc (400 mL), se enjuagó con agua (300 mL) y la capa de agua se extrajo con EtOAc (300 mL). Las capas orgánicas combinadas se enjuagaron con agua (200 mL), bicarbonato de sodio sat'd (2 x 200 mL), NaCl Sat'd (100 mL), se secaron con MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a un jarabe. El jarabe se disolvió en tolueno (200 mL) y se purificó por cromatografía flash sobre un tapón de gel de sílice (13 x 15 cm, 2L de sílice seco) eluido con hexanos/aceto de etilo (10%, 4 L; 15%, 4 L; 17.5%, 8 L; 25%, 4 L) para rendir el compuesto 110 como un sólido espumoso blanquecino. (33.6 g, 69%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.83 (td, *J* = 8.2, 5.7 Hz, 1H), 7.64-7.48 (m, 5H), 7.39 (broad d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.30 (dd, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.02-3.90 (m, 1H), 1.76-1.66 (m, 1H), 1.62-1.46 (m, 1H), 2H; 1.33 (s, 9H); 0.63 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H). ESI-MS *m/z* = 398.3 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 110 se muestran a continuación.



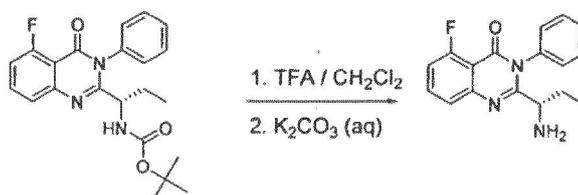
5

(S)-2-(1-amino-propil)-5-fluoro-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (111)

10 **[0292]** Paso D: Una solución del Compuesto 110 (85 mmol) en diclorometano (60 mL) se trató con ácido trifluoroacético (60 mL). La mezcla de la reacción se agitó por 1 h, se concentró in vacuo, y se particionó entre diclorometano (150 mL) y 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (suficiente cantidad para mantener el pH en más de 10). La capa acuosa se extrajo con diclorometano adicional (100 mL) y las capas orgánicas combinadas se enjuagaron con agua (50 mL) y salmuera (50 mL). Luego de secar con MgSO<sub>4</sub>, la solución se concentró para proporcionar el compuesto 111 como un sólido blanquecino (22 g, 88%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.73-7.65 (m, 1H), 7.62-7.49 (m, 4H), 7.32-7.22 (m, 2H), 7.13-7.06 (m, 1H), 3.42 (dd, J = 7.5, 5.2 Hz, 1H), 1.87-1.70 (m, 1H), 1.58-1.43 (m, 1H), 0.80 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ESI-MS *m/z* 298.2 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 111 se muestran a continuación.

15

20



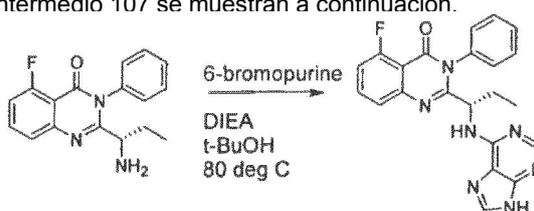
25

(S)-5-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (107)

30 **[0293]** Paso E: Una suspensión del compuesto 111 (65.6 mmol, eq), 6-bromopurina (14.6 g, 73.4 mmol, 1.1 eq) y DIEA (24.3 mL, 140 mmol, 2 eq) en tert-butanol (40 mL) se agitó por 24 h a 80 °C. la mezcla de la reacción se concentró in vacuo y se trató con agua para rendir un producto crudo sólido que se recolectó por filtración al vacío, se enjuagó con agua y se secó con aire. La mitad del producto crudo sólido obtenido se disolvió en MeOH (600 mL), se concentró sobre gel de sílice (300 mL seco), y se purificó por cromatografía flash (7.5 x 36 cm, eluido con 10 L de 4% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para rendir un producto sólido. El producto sólido se disolvió luego en EtOH (250 mL) y se concentró in vacuo al compuesto 107 como un sólido amarillo claro (7.2 g, 50%). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, 80 °C, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12.66 (broad s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.02 (broad s, 1H), 7.81-7.73 (m, 1H), 7.60-7.42 (m, 6H), 7.25-7.15 (m, 2H), 4.97 (broad s, 1H), 2.02-1.73 (m, 2H), 0.79 (t, J = 7.3 Hz, 3H). ESI-MS *m/z* 416.2 (MH<sup>+</sup>). C, H, N análisis elemental (C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>7</sub>OF · EtOH · 0.4 H<sub>2</sub>O). Pureza quiral 99.8:0.2 (S:R) usando HPLC quiral (columna 4.6 x 250 mm Chiralpak ODH, 20 °C, 85:15 hexanes:EtOH, 1 mL/min, muestra cargada a una concentración de 1 mg/mL en EtOH). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 107 se muestran a continuación.

35

40



45

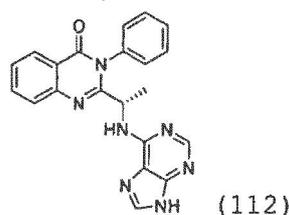
(S)-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (112)

50

55 **[0294]** El Compuesto 112 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitrobenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico en el paso A, y N-BOC-L-alanina se sustituyó por ácido N-BOC-L-2-aminobutírico en el paso B. ESI-MS *m/z* 384.3 (MH<sup>+</sup>). Pureza quiral 99.5:0.5 (S:R). El Compuesto 112 se muestra abajo

55

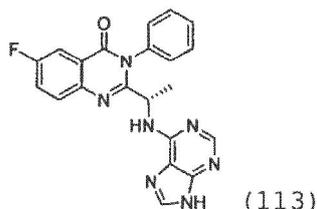
60



(S)-6-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (113)

5 **[0295]** El Compuesto 113 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitro-5-fluorobenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico en el paso A, y N-BOC-L-alanina se sustituyó por ácido N-BOC-L-2-aminobutírico en el paso B. ESI-MS  $m/z$  402.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 99.9:0.1 (S:R). El Compuesto 113 se muestra abajo.

10



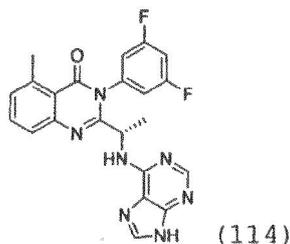
15

(S)-3-(3,5-difluoro-fenil-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (114)

20

**[0296]** El Compuesto 114 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitro-5-metilbenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico y 3,5-difluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, y N-BOC-L-alanina se sustituyó por ácido N-BOC-L-2-aminobutírico en el paso B. ESI-MS  $m/z$  434.3 ( $MH^+$ ). El Compuesto 114 se muestra abajo.

25



30

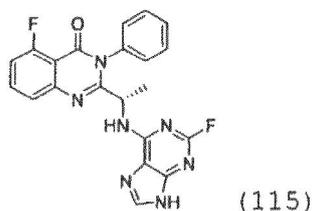
(S)-5-fluoro-2-[1-(2-fluoro-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (115)

35

**[0297]** El Compuesto 115 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitro-6-fluorobenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico en el paso A, N-BOC-L-alanina se sustituyó por ácido N-BOC-L-2-aminobutírico en el paso B y 6-cloro-2-fluoropurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso E. ESI-MS  $m/z$  420.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 100:0 (S:R). El Compuesto 115 se muestra abajo.

40

45

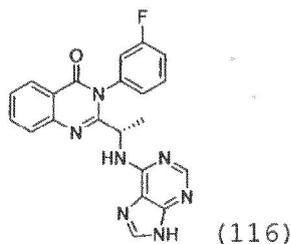


50

(S)-3-(3-fluoro-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (116)

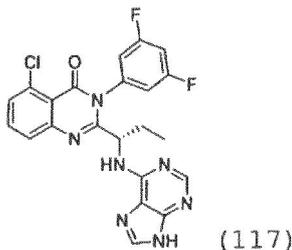
55 **[0298]** El Compuesto 116 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitrobenzoico por 2-fluoro-6-nitrobenzoico y 3-fluoroanilina fue sustituida por anilina en el paso A y N-BOC-L-alanina fue sustituida por ácido N-BOC-L-2-aminobutírico en el paso B. ESI-MS  $m/z$  402.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 96:4 (S:R). El Compuesto 116 se muestra abajo.

60



(S)-5-fluoro-3-(3,5-difluoro-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (117)

10 **[0299]** El Compuesto 117 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitro-5-clorobenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico y 3,5-difluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A. ESI-MS  $m/z$  468.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 100:0 (S:R). El Compuesto 117 se muestra abajo.



(S)-3-(2,6-difluoro-fenil-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (118)

30 **[0300]** El compuesto 118 se preparó usando un paso B alternativo en relación con la preparación del compuesto 107, pero el procedimiento general descrito antes para el compuesto 107 generalmente se siguió para cada uno de los pasos A, C y D.

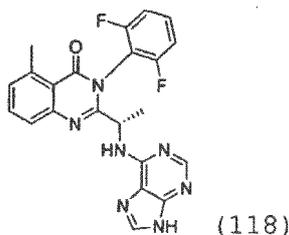
N-(2,6-difluoro-fenil)-2-metil-6-nitro-benzamida (118a)

35 **[0301]** Paso A: [0298] El Compuesto 118a se preparó siguiendo el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-nitro-5-metilbenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico y 2,6-fluoroanilina fue sustituida por anilina.

tert-butil éster de ácido L-{2-[(2,6-difluoro-fenil)-(2-metil-6-nitro-benzoil)-amino]-1-metil-2-oxo-etil}-carbámico(118b)

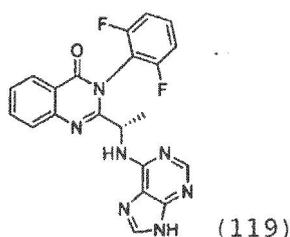
40 **[0302]** Paso B: El compuesto 118b se preparó tratando una solución del compuesto 118a (13.8 g, 47 mmol) en THF (200 mL) gota a gota con una solución de hexametildisilazida de potasio (KHMDs) (0.5 M en tolueno, 95 mL, 47 mmol, 1 eq) a 0°C y agitando la mezcla de la reacción por 30 minutos a la misma temperatura. La mezcla de la reacción se trató luego con ácido L-2-tert-butoxicarbonilamino-propiónico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster (13.5 g, 47 mmol, 1 eq) y se agitó a la misma temperatura por 30 min más. La mezcla de la reacción se refrescó con agua (50 mL) y se concentró in vacuo. El residuo se disolvió en acetato de etilo (300 mL), y se enjuagó con 100 mL de cada uno de los siguientes: (1) agua, (2) bicarbonato de sodio sat'd, (3) agua, (4) 5% ácido cítrico, (5) agua y (6) salmuera. La capa orgánica se secó con  $MgSO_4$  y se concentró a un jarabe. El material crudo se disolvió en diclorometano (75 mL) y se purificó por cromatografía flash sobre gel de sílice (7.5 x 40 cm), eluido con 20% (EtOAc en hexanos (10 L de 20%, luego 6 L de 33%).

50 **[0303]** Los pasos C y D se realizaron como se describe en relación con la preparación del compuesto 107. ESI-MS  $m/z$  434.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 100:0 (S:R). El Compuesto 118 se muestra abajo.



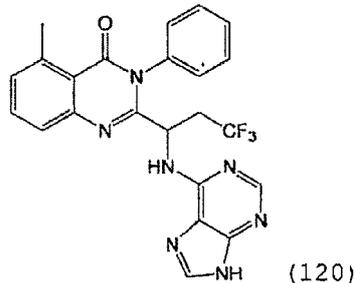
(S)-3-(2,6-difluoro-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (119)

65 **[0304]** El Compuesto 119 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 118, pero se sustituyó ácido 2-nitrobenzoico por ácido 2-amino-5-metil-benzoico. ESI-MS  $m/z$  420.3 ( $MH^+$ ). Pureza quiral 100:0 (S:R). El Compuesto 119 se muestra abajo.



5-metil-3-fenil-2-[3,3,3-trifluoro-1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (120)

**[0305]** El Compuesto 120 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 107, pero se sustituyó ácido 2-metil-6-nitrobenzoico por ácido 2-fluoro-6-nitrobenzoico en el paso A, y ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-4,4,4-trifluoro-butírico se sustituyó por ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-butírico en el paso B. ESI-MS  $m/z$  466 ( $MH^+$ ). El Compuesto 120 se muestra abajo.



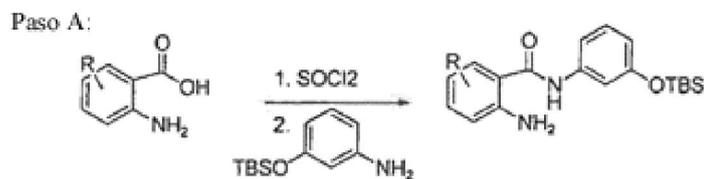
### **EJEMPLO 10** (Referencia)

#### **PREPARACIÓN DEL COMPUESTO**

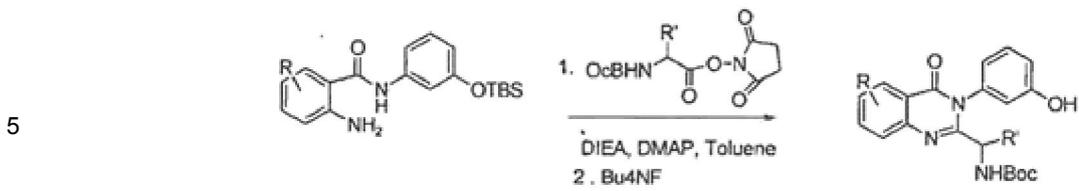
**[0306]** Los compuestos que tienen fórmula general I (mostrada antes) se han preparado de acuerdo con los pasos A-D del esquema sintético titulado "Procedimiento C" mostrado a continuación. Un esquema sintético alternativo titulado "Esquema D" ilustra las rutas sintéticas adicionales a los compuestos que tienen la fórmula I.

#### **Procedimiento C:**

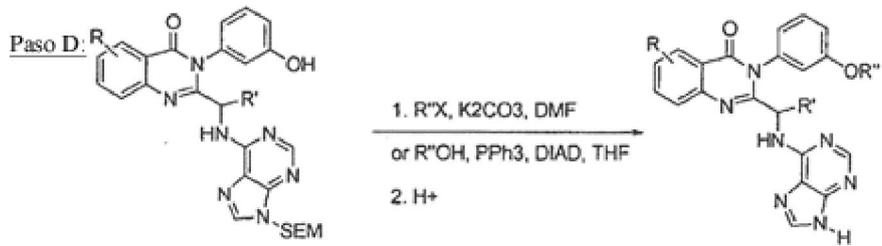
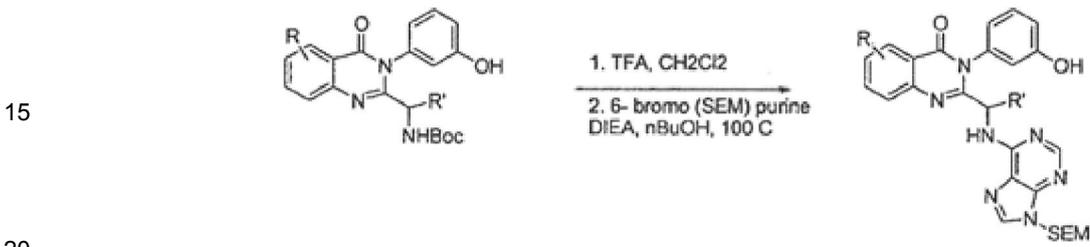
##### **[0307]**



Paso B:



Paso C:



Esquema D

35

40

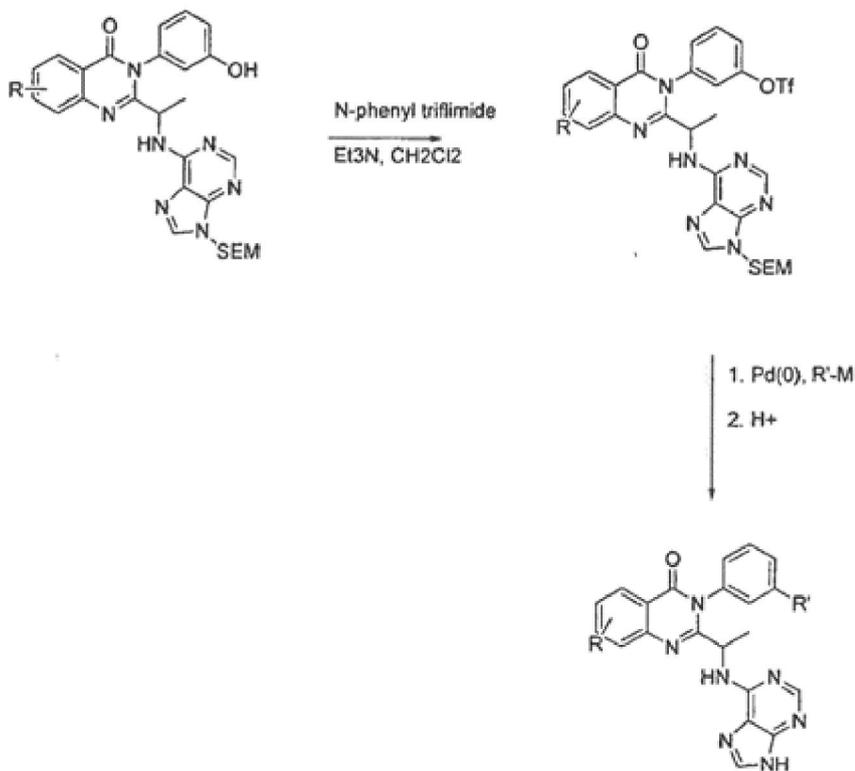
45

50

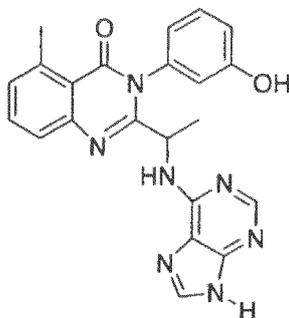
55

60

65



**[0308]** La síntesis de los compuestos de acuerdo con el Procedimiento C y el Esquema D es ejemplificado primero por el procedimiento sintético para 3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona, también referido como compuesto 121, cuya estructura se muestra abajo.



3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (121)

**[0309]** El compuesto 121 se preparó siguiendo los pasos A-D a continuación, y usando el compuesto 122 (a continuación) en el paso A.

3-(tert-butil dimetilsililoxi fenilamina (122)

**[0310]** Se purgó un matraz de fondo redondo de un cuello de 250 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con cloruro de tert-butildimetilsilil (12.5 g, 82.8 mmol), imidazol (7.64 g, 112 mmol) y DMF anhidro (60 mL). Se agregó 3-aminofenol (10.0 g, 91,7 mmol) a la solución resultante. Luego de agitar por 12 horas a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se vertió en agua (300 mL). La suspensión resultante se extrajo con hexanos (3 x 300 mL) y los extractos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. La concentración del filtrado seguida por cromatografía de columna dio el compuesto 122 como un aceite amarillo pálido.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm), 6.84 (t, 1H,  $J = 7.9$  Hz), 6.16 (d, 1H,  $J = 6.7$  Hz), 6.10 (m, 1H), 5.97 (d, 1H,  $J = 9.1$  Hz), 4.98 (s, 2H), 0.95 (s, 9H), 0.16 (s, 6H);  $m/z = 224$  (M+H).

2-amino-6-metil-N-[(3-tert-butil-dimetil-silanoxi)-fenil]-benzamida (123)

**[0311]** Paso A: Se cargó un matraz de fondo redondo, de tres cuellos de 5 L equipado con una fuente de gas, agitador mecánico y condensador de reflujo con ácido 6-amino-2-metilbenzoico (25 g, 16.8 mmol), tolueno (300 mL), y cloruro de tionilo (50 mL). La mezcla de la reacción se reflujo por 1 h hasta que la evolución del gas cesó. La mezcla resultante se enfrió y concentró bjo presión reducida a 50°C. Se agregó THF anhidro (400 mL) y DIEA (90 mL) al residuo resultante, seguido por el compuesto 122 (37 g, 1.0 eq). La mezcla de la reacción resultante se agitó a temperatura ambiente por 2 horas, luego se refrescó con la adición de 20% carbonato de potasio acuoso (250 mL). La capa orgánica se separó y concentró a sequedad bajo presión reducida. La trituración del residuo con MtBE (70 mL), filtración y secado produjo el compuesto 123. La preparación del compuesto 123 generalmente se muestra antes como el paso A del Procedimiento C.

éster tert-butil de ácido 1-[[3-(3-Hidroxi-fenil)-5-metil-4-oxo-3,4-dihidro-quinazolin-2-il]-etil]-carbámico (124)

**[0312]** Paso B: Se purgo un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 100 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con nitrógeno y se cargó con el compuesto 123 (10g, 28 mmol), *N*-tert-butiloxycarbonilalanina *N*-hidroxi-succinimida éster (9.60 g, 1.0 eq), DMAP (1.90 g), DIEA (6 mL), tamices moleculares de 4Å (1.20 g), y tolueno anhidro (100 mL). La mezcla resultante se calentó en un baño de aceite a 80°C por 24 h. Se agregó 1-hidroxibenzotriazol (3.78 g) a la reacción, y el calentamiento continuó por 48 h más. Luego de enfriar, se agregaron tolueno (10 mL) y CELITE® (0.70 g) a la mezcla de reacción tibia, seguida por filtración y evaporación del filtrado para dar un residuo marrón. El residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) y se trató con una solución de fluoruro de tetrabutilamonio (5.12g) en MeOH (15 mL). Luego de agitar por 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se evaporó a sequedad bajo presión reducida, y el residuo se purificó por cromatografía de columna para dar rendimiento del 81% del compuesto 124 como un sólido blanquecino. La preparación del compuesto 124 generalmente se muestra antes como el paso B del Procedimiento C.

2-(1-amino-etil)-3-(hidroxi-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (125)

**[0313]** Paso C1: Se cargó un matraz de fondo redondo, tres cuellos de 100 mL equipado con un agitador magnético con el compuesto 124 (4.50 g, 11.18 mmol), en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) y TFA (15 mL). Luego de agitar por 1 h a temperatura ambiente, la mezcla se concentró bajo presión reducida para lograr el compuesto 125, el cual se usó tal cual en el siguiente paso.

5 3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-2-{1-[9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purin-6-ilamino]-etil}-3H-quina-zolin-4-ona (126)

10 **[0314]** Paso C2: Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 50 ml purgado con nitrógeno equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con el compuesto 125 (2.4 g, 8.16 mmol), compuesto intermedio 10 (2.70 g, 1.0 eq), n-butanol (20 mL), y DIEA (4.2 mL). La mezcla se calentó a 100 °C por 4 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La concentración de la mezcla de la reacción bajo alto vacío seguido por cromatografía de columna dio el compuesto como un sólido blanco. La preparación del compuesto 126 generalmente se muestra antes como el paso C del Procedimiento C.

15 3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (121)

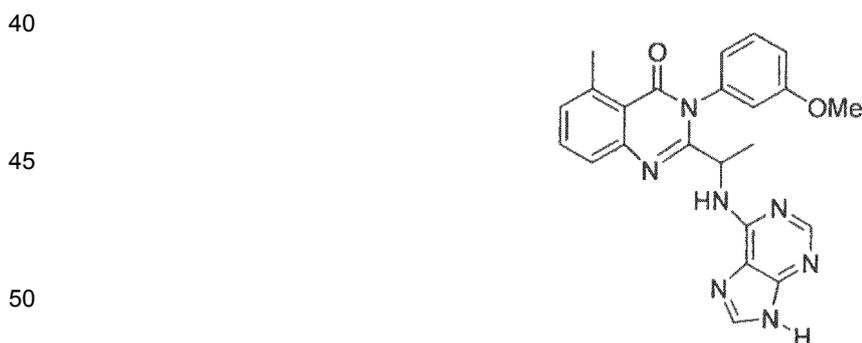
20 **[0315]** Paso D: Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 100 mL equipado con un agitador magnético con el compuesto 126 (294 mg, 0.5 mmol), MeOH (15 mL) y 4N ácido clorhídrico (15 mL), y la mezcla de la reacción se calentó por 5 h a 40°C. La evaporación del metanol bajo presión reducida seguida por alcalinización a pH 10 con 10% carbonato de potasio acuoso dio un precipitado blanco. El precipitado se filtró, se enjuagó con agua y se secó bajo vacío toda la noche a temperatura ambiente para lograr el compuesto 121 como un sólido blanco. *m/z*= 414 (M+H). La preparación del compuesto 121 generalmente se muestra antes como el paso D del Procedimiento C.

25 3-(3-metoxi-fenil)-5-metil-2-{1-[9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purin-6-ilamino]-etil}-3H-quina-zolin-4-ona (127)

30 Se cargó un matraz de fondo redondo, un cuello de 100 mL equipado con un agitador magnético con el compuesto 126 (370 mg, 0.68 mmol), carbonato de potasio (235 mg, 1.70 mmol) y DMF (4 mL). La mezcla resultante se agitó por 5 min, y se agregó yoduro de metilo (435 mg, 3.10 mmol). Luego de agitar por 1 h a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El resultante se purificó por cromatografía de columna para dar rendimiento del 82% del compuesto 127 como un aceite amarillo pálido. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm) 8.20 (m, 2H), 6.99-7.66 (m, 7 H), 5.58 (s, 2H), 5.15 (bs, 1H), 3.62 (dt, 2H, J = 1.8, 8.0 Hz), 3.32 (s, 3H), 2.78 (s, 3H), 1.55 (m, 3H), 0.88 (m, 2H), -0.07 (s 9H); *m/z* = 558 (M+H).

35 3-(3-metoxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (128)

**[0317]** El compuesto 127 se reaccionó de acuerdo con el procedimiento descrito antes para el compuesto 121 (paso D) para proporcionar el compuesto 128. *m/z* = 428 (M+H). La estructura del compuesto 128 se muestra abajo.

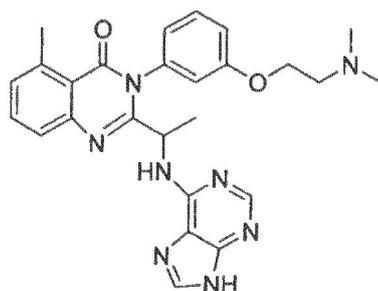


55 3-(3-metoxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (128)

**3-[3-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-5-metil-2-{1-[9H-purin-6-ylamino]-etil}-3H-quinazolin-4-ona (129)**

60 **[0318]** El compuesto 126 (300 mg, 0.54 mmol) se trató con sal de clorhidrato de 2-cloro etildimetilamina a 90°C por 17 h, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. El compuesto resultante fue tratado con 4N HCl, en MeOH, usando el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D). Se obtuvo el Compuesto 129. *m/z*= 485(M+H). La estructura del compuesto 129 se muestra abajo.

65



5

10

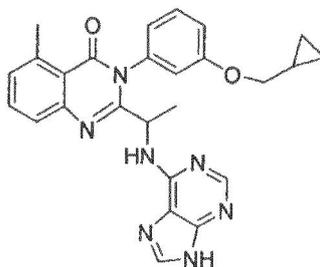
3-[3-(2-Dimetilamino-etoxi)-fenil]-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (129)

**3-(3-ciclopropilmetoxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (130)**

15

**[0319]** El compuesto 126 (300 mg, 0.54 mmol) se trató con bromoetil ciclopropano usando el procedimiento esbozado para el compuesto 127 a temperatura ambiente por 24 h. Este intermediario fue tratado con 4N HCl de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D).  $m/z = 468$  (M+H). La estructura del compuesto 130 se muestra abajo.

20



25

30

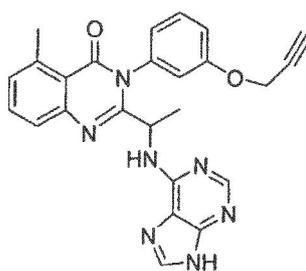
3-(3-Ciclopropilmetoxi-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (130)

**5-metil-3-(3-prop-2-iniloxi-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (131)**

35

**[0320]** El compuesto 126 (300 mg, 0.54 mmol) se trató con bromuro de propargil a temperatura ambiente por 24 h, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. Este intermedio fue tratado con 4N HCl de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D).  $m/z = 467$  (M+H). La estructura del compuesto 131 se muestra abajo.

40



45

50

5-metil-3-(3-prop-2-iniloxi-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (131)

**2-[1-[2-amino-9H-purin-6-ilamino]etil]-3-(3-hidroxifenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (132)**

55

**[0321]** El compuesto 132 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

60

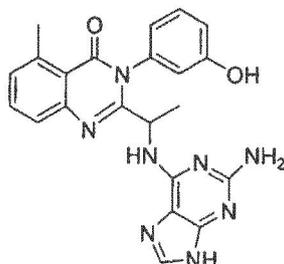
**2-[1-[2-ditert-butiloxycarbonilamino-9-(2-trimetilsililetoximetil)-9H-purin-6-ilamino]etil]-3-(3-hidroxifenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (133)**

65

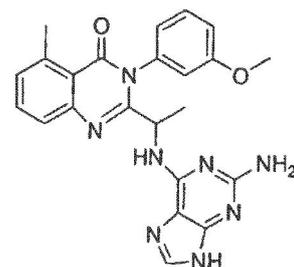
**[0322]** Paso A: Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 50 mL purgado con nitrógeno equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con el compuesto 125 (3.02 g, 10.2 mmol), compuesto intermedio 12 (5.56 g, 1.0 eq), n-butanol (20 mL), y DIPEA (6.0 mL). La mezcla se calentó a 100 °C por 1 hora y se enfrió a temperatura ambiente. La concentración de la mezcla de la reacción bajo alto vacío seguido por cromatografía de columna dio el compuesto 133 como un sólido blanco.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-hidroxifenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (132)

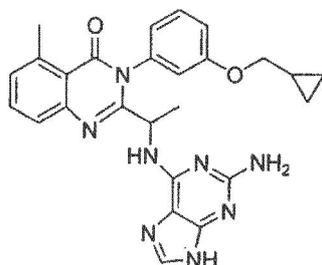
**[0323]** Paso B: El compuesto 133 se disolvió en MeOH (3 mL), se trató con 4N HCl (3 mL) y se calentó a 40°C por 6 h. La mezcla de la reacción se concentró aproximadamente a la mitad del volumen y se particionó entre agua (5 mL) y acetato de etilo (10 mL). La capa acuosa se separó, se alcalinizó con carbonato de potasio a pH 10 y se filtró. Luego de enjuagar el pastel del filtro con agua (5 mL) y secar bajo vacío, se obtuvo el compuesto 132 como un sólido blanco.  $m/z = 429$  (M+H). La estructura del compuesto 132 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (132)2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-metoxifenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (134)

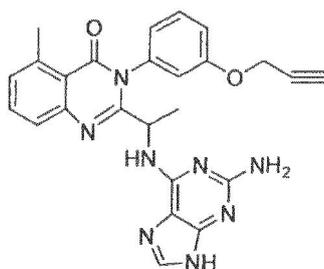
**[0324]** El compuesto 133 (300 mg, 0.39 mmol) se trató con yoduro de metilo, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. Este intermedio fue tratado con 4N HCl en metanol de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 132 (paso B).  $m/z = 443$  (M+H). La estructura del compuesto 134 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-metoxi-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (134)2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-ciclopropilmetoxi-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (135)

**[0325]** El compuesto 133 (231 mg, 0.30 mmol) se trató con bromuro de ciclopropilmetilo, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. El intermedio generado fue tratado con 4N HCl en MeOH de acuerdo con el procedimiento descrito antes para el compuesto 132 (paso B).  $m/z = 483$  (M+H). La estructura del compuesto 135 se muestra abajo.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-ciclopropilmetoxi-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (135)2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-(3-prop-2-iniloxi-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (136)

**[0326]** El compuesto 133 (231 mg, 0.30 mmol) se trató con bromuro de propargil, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. El intermedio generado fue tratado con 4N HCl en MeOH de acuerdo con el procedimiento descrito antes para el compuesto 132 (paso B).  $m/z = 467$  (M+H). La estructura del compuesto 136 se muestra abajo.



5

10

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ylamino)etil]-5-metil-3-prop-2-iniloxi-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (136)

3-(3-etinil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (137)

15

**[0327]** El compuesto 137 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-C a continuación.

20

ácido Trifluorometano sulfónico 3-(5-metil-4-oxo-2-[1-[9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purin-6-ylamino]-etil]-4H-quinazolin-3-yl)-fenil éster (138)

20

**[0328]** Paso A: Se purgó un matraz de fondo redondo, tres cuellos de 50 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con el compuesto 126 (500 mg, 0.92 mmol), trietilamina (218 mg, 2.16 mmol), cloruro de metileno anhidro (10 mL) y *N*-feniltrifluorometanosulfonimida (496 mg, 1.39 mmol). Luego de agitar por 2 h a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se particionó entre cloruro de metileno (50 mL) y 10% carbonato de potasio acuoso (50 mL). La capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y se filtró. La concentración del filtrado seguida por cromatografía en columna produjo un rendimiento del 77% del compuesto 138 como un sólido blanquecino.  $^1\text{H NMR}$  (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 8.32 (bs, 1H), 7.48-8.18 (m, 7H), 7.30 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 5.51 (s, 2H), 4.75-4.85 (m, 1H), 3.55 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 2.72 (s, 3H), 1.46 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz), 0.83 (dt, 2H,  $J = 1.6, 8.1$  Hz), -0.09 (s, 9H).

25

30

**5-Metil-2-[1-[9-(2-trimetilsililetoximetil)-9H-purin-6-ylamino]etil]-3-(3-trimetilsililetilfenil)-3H-quinazolin-4-ona (139)**

35

**[0329]** Paso B: Un vial de reacción de 5 mL equipado con un agitador magnético se purgó con nitrógeno y se cargó con el compuesto 138 (220 mg, 0.33 mmol), diclorobis(trifenilfosfin)paladio(II) (27.1 mg, 0.039 mmol), y DMF anhidro (1 mL). Se agregó trietilamina (146 mg, 1.44 mmol) y (trimetilsilil)acetileno (102 mg, 1.04 mmol), y la mezcla de la reacción se agitó por 10 h a 90°C y por 8 h más a 100°C. La Evaporación de la mezcla de la reacción seguida por purificación en cromatografía de columna logró 63% de rendimiento del compuesto 139 como un sólido blanquecino.  $^1\text{H NMR}$  (CD $_3$ O $\otimes$ )  $\delta$  (ppm) 7.43-8.33 (m, 8H), 7.30 (d, 1H,  $J = 6.6$  Hz), 5.64 (s, 2H), 5.14 (bs, 1H), 3.68 (t, 2H,  $J = 8.0$  Hz), 2.81 (s, 3H), 1.59-1.64 (m, 3H), 0.94 (m, 2H), 0.32 (s, 9H), -0.09 (s, 9H).

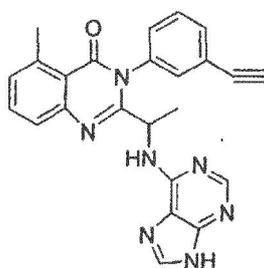
40

3-(3-etinil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (137)

45

**[0330]** Paso C: El compuesto 139 (113 mg, 0.18 mmol) fue tratado con 4N HCl en MeOH de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D). Esto logró el compuesto 137.  $m/z = 422$  (M+H). La estructura del compuesto 137 se muestra abajo.

50



55

3-(3-Etinil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (137)

60

3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ylamino)-etil]-4H-quinazolin-3-yl}-benzonitrilo (140)

**[0331]** El compuesto 140 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

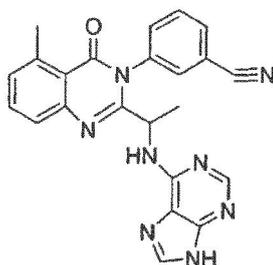
65

3-(5-metil-4-oxo-2-[1-[9-(2-trimetilsililetoximetil)-9H-purin-6-ylamino]etil]-4H-quinazolin-3-yl)ben-zonitrilo (141)

**[0332]** Paso A: Un vial de reacción de 5 mL equipado con un agitador magnético se cargó con el compuesto 138 (200 mg, 0.300 mmol), tetrakis(trifenilfosfin)paladio (34.0 mg, 0.029 mmol), cianuro de zinc (70 mg, 0.60 mmol) y DMF anhidro (1 mL). El vial se purgó con nitrógeno, se calentó a 120°C por 3.5 h luego se enfrió a temperatura ambiente y se vertió en una solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (25 mL). La suspensión resultante se extrajo con cloruro de metileno (3 x 20 mL) y los extractos orgánicos se combinaron, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. La concentración del filtrado seguida por purificación por cromatografía de columna dio un rendimiento de 66% del compuesto 141 como un sólido blanco. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.30 (d, 1H, J = 6.9 Hz), 7.58-8.02 (m, 7H), 7.30 (d, 1H, J = 7.0 Hz), 5.60 (s, 2H), 5.07 (bs, 1H), 3.65 (m, 2H), 2.84 (s, 3H), 1.58 (d, 3H, J = 6.7 Hz), 0.96 (m, 2H), 0.02 (s, 9H).

3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-benzonitrilo (140)

**[0333]** Paso B: El compuesto 141 se trató con 4N HCl en MeOH por 1 hora usando el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso B) para proporcionar el compuesto 140. *m/z* = 423 (M+H). La estructura del compuesto 140 se muestra abajo.



3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-benzonitrilo (140)

3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (142)

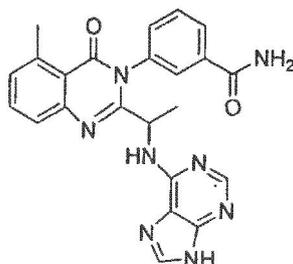
**[0334]** El compuesto 142 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

3-(5-Metil-4-oxo-2-{1-[9-(2-trimetilsililetoximetil)-9H-purin-6-ilamino]etil}-4H-quinazolin-3-il)benzamida (143)

**[0335]** Paso A: Se purgo un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 100 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con nitrógeno y se cargó con el compuesto 141 (219 mg, 0.40 mmol), y cloruro de metileno anhidro (15 mL). Se agregó *N,N*-Dietilhidroxilamina (146 mg, 1.64 mmol) a la solución resultante, y la mezcla de la reacción se calentó por 16 h a 50°C, se enfrió a temperatura ambiente, y luego se evaporó a sequedad bajo presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna para dar rendimiento del 97% del compuesto 143 como un sólido blanco. m.p. 195-197 °C; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.34 (d, 1H, J = 10.9 Hz), 7.59-8.06 (m, 7H), 7.28 (m, 1H), 6.95 (bs, 1H), 6.00 (bs, 2H), 5.60 (s, 2H), 5.28 (bs, 1H), 3.62 (t, 2H, J = 8.4 Hz), 2.85 (s, 3H), 1.53 (dd, 3H, J = 6.7, 10.8 Hz), 0.96 (t, 2H, J = 8.3 Hz), 0.01 (s, 9H); *m/z* = 571 (M+H).

3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (142)

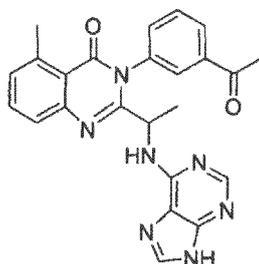
**[0336]** Paso B: El compuesto 143 se trató con 4N HCl en MeOH por 1.5 horas usando el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D) para proporcionar el compuesto 142. *m/z* = 441 (M+H). La estructura del compuesto 142 se muestra abajo.



3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (142)

3-(3-acetil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (144)

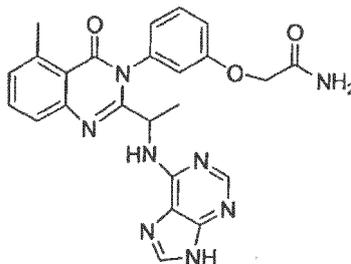
[0337] El compuesto 139 se trató con 4N HCl en MeOH a 70°C por 16 horas de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D). Esta reacción logró el compuesto 144, cuya estructura se muestra a continuación.  $m/z = 440$  (M+H).



3-(3-acetil-fenil)-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (144)

2-(3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-fenoxi)-acetamida (145)

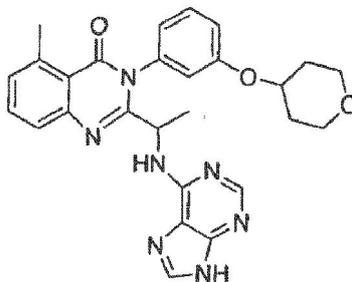
[0338] El compuesto 126 (300 mg, 0.54 mmol) se trató con 2 bromo acetamida, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. La reacción fue bajo reflujo por 24 h en CH<sub>3</sub>CN. Este intermediario fue tratado con 4N HCl en MeOH por 1 hora siguiendo el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D) para proporcionar el compuesto 145.  $m/z = 471$  (M+H). La estructura del compuesto 145 se muestra abajo.



2-(3-{5-metil-4-oxo-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-4H-quinazolin-3-il}-fenoxi)-acetamida (145)

5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(tetrahidropuran-4-iloxi)-fenil]-3H-quinazolin-4-ona (146)

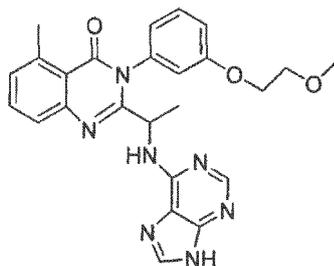
[0339] Se purgó un matraz de fondo redondo, tres cuellos de 25 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con el compuesto 126 (270 mg, 0.5 mmol), tetrahidropiran-4-ol (60  $\mu$ L), trifenilfosfina (560 mg), THF (5 mL) y dietil azodicarboxilato (340  $\mu$ ). Luego de agitar por 16 horas a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción evaporó a sequedad, y el residuo se disolvió en metanol (3 mL), se trató con 4N ácido clorhídrico (3 mL) y se calentó a 40°C por 6 h. La mezcla de la reacción se concentró aproximadamente a la mitad del volumen y se particionó entre agua (5 mL) y acetato de etilo (10 mL). La capa acuosa se separó, se alcalinizó con carbonato de potasio a pH 10 y se filtró. Luego de enjuagar el pastel del filtro con agua (5 mL) y secar bajo vacío, el compuesto 146 fue obtenido.  $m/z = 498$  (M+H). La estructura del compuesto 146 se muestra abajo.



5-Metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(tetrahidro-piran-4-iloxi)-fenil]-3H-quinazolin-4-ona (146)

3-[3-(2-metoxi-etoxi)-fenil]-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (147)

[0340] El compuesto 126 (300 mg, 0.54 mmol) se trató con 2-metoxi etil éster de ácido tolueno 4-sulfónico a 50°C por 42 h, usando el procedimiento descrito antes para el compuesto 127. El intermedio generado fue tratado con 4N HCl, en MeOH, usando el procedimiento descrito para el compuesto 121 (paso D).  $m/z = 487$  (M+H).



5

10

3-[3-(2-metoxi-etoxi)-fenil]-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (147)

15

6-fluoro-2-[1-[9H-purin-6-ilamino]-etil]-3-[3-(tetrahidropiran-4-iloxi)-fenil]-3H-quinazolin-4-ona (148)

**[0341]** El compuesto 148 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

20

6-fluoro-3-(3-hidroxi-fenil)-5-metil-2-[1-[9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purin-6-ilamino]-etil]-3H-quinazolin-4-ona (149)

**[0342]** Paso A: El compuesto 149 se obtuvo a partir de ácido 6-amino-3-fluoro benzoico usando los procedimientos descritos antes para los compuestos 123, 124, 125 y 126.

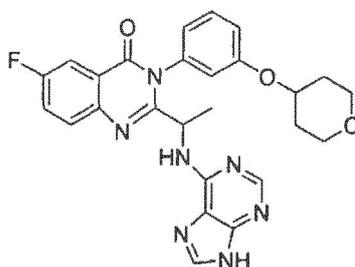
25

6-fluoro-2-[1-[9H-purin-6-ilamino]-etil]-3-[3-(tetrahidropiran-4-iloxi)-fenil]-3H-quinazolin-4-ona (148)

**[0343]** Paso B: El compuesto 148 se obtuvo a partir del compuesto 149 usando el procedimiento descrito para el compuesto 146.

$m/z=502$  (M+H). La estructura del compuesto 148 se muestra abajo.

30



35

40

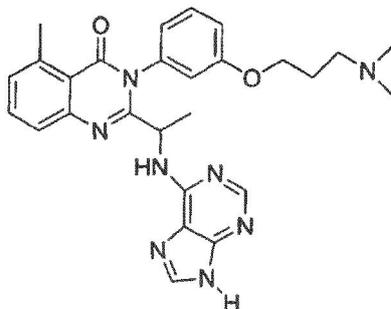
6-fluoro-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(tetrahidropiran-4-iloxi)-fenil]-3H-quinazolin-4-ona (148)

45

3-[3-(3-dimetilamino-propoxi)-fenil]-5-metil-2-[1-[9H-purin-6-ilamino]-etil]-3H-quinazolin-4-ona (150)

**[0344]** El compuesto 150 se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito antes para el compuesto 146 pero se usó 3-dimetil-amino-1-propanol en lugar de tetrahidropiran-4-ol.  $m/z = 499$  (M+H). La estructura del compuesto 150 se muestra abajo.

50



55

60

3-[3-(3-Dimetilamino-propoxi)-fenil]-5-metil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (150)

65

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-etinil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (151)

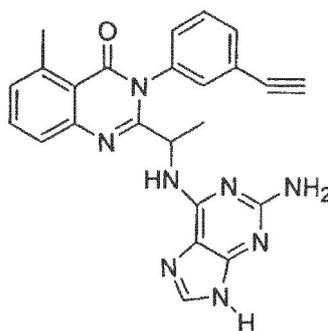
[0345] El compuesto 151 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

ácido Trifluorometano sulfónico 3-{2-[1-(2-ditertbutiloxicarbonilamino-9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-fenil éster (152)

[0346] Paso A: El compuesto 152 se obtuvo a partir del compuesto 133 el cual se reaccionó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 138.

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-etinil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (151)

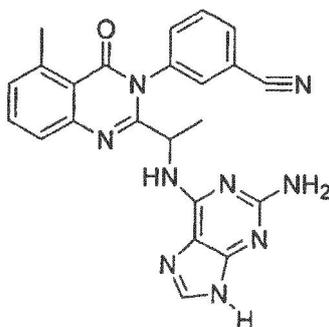
[0347] Paso B: El compuesto 151 se obtuvo a partir del compuesto 152 el cual se reaccionó de acuerdo con el procedimiento descrito para los compuestos 139 y 137 (paso C). La estructura del compuesto 151 se muestra abajo.



2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-(3-etinil-fenil)-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (151)

3-{2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-benzonitrilo (153)

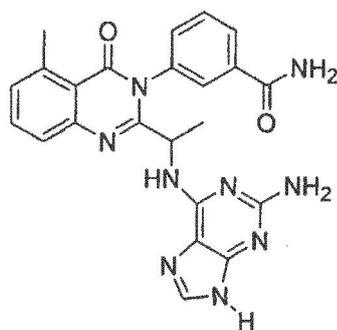
[0348] El compuesto 153 se obtuvo a partir del compuesto 152 el cual se reaccionó de acuerdo con el procedimiento para los compuestos 141 y 140 (paso D) descritos antes.  $m/z = 438$  (M+H). La estructura del compuesto 153 se muestra abajo.



3-{2-[1-(2-Amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-benzonitrilo (153)

3-{2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (154)

[0349] El compuesto 154 se obtuvo reaccionando primero el compuesto 152 de acuerdo con el procedimiento para el compuesto 141. Este producto de reacción se reaccionó luego de acuerdo con el procedimiento para los compuestos 143 y 142 (paso B).  $m/z = 456$  (M+H). La estructura del compuesto 154 se muestra abajo.



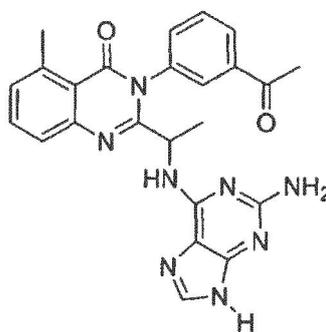
5

10 3-{2-[1-(2-Amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (154)

3-{2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-4-oxo-4H-quinazolin-3-il}-benzamida (155)

15 **[0350]** El compuesto 155 se obtuvo reaccionando primero el compuesto 151 de acuerdo con el procedimiento para el compuesto 139. Este producto de reacción se trató de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 144.  $m/z = 455$  (M+H). La estructura del compuesto 155 se muestra abajo.

20



25

30

3-(3-acetil-fenil)-2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (155)

35

**5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (156)**

**[0351]** El compuesto 156 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A y B a continuación.

40

5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-2-[1-(9-(2-trimetilsilaniletoximetil)-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (157)

45 **[0352]** Paso A: Un vial de reacción de 3 mL se cargó con el compuesto 138 (96.1 mg, 0.142 mmol), acetato de paladio (II) (3.20 mg, 0.014 mmol), carbonato de cesio (84.2 mg, 0.258 mmol) y (+)-BINAP (es decir, 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil) (13.8 mg, 0.022 mmol). El vial fue enjuagado con nitrógeno por 10 min. Luego se agregó tolueno (0.3 mL) y morfolina (18 mL), y la solución se calentó a 100°C por 6 h. Posteriormente, la solución se diluyó con diclorometano (5 mL), se filtró, y el filtrado se concentró bajo presión reducida. La HPLC preparativa del residuo proporcionó el compuesto 157 como un aceite amarillo.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CH}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) 8.24-8.30 (m, 2H), 7.48-7.72 (m, 3H), 7.33 (m, 2H), 6.94-7.13 (m, 3H), 5.56 y 5.64 (dos s,  $\text{CH}_2$  relación de rotámero 1:10), 5.15-5.30 (m, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.76 (m, 2H), 3.67 (m, 2H), 3.28 (m, 1H), 2.97-3.15 (m, 3H), 2.84 (s, 3H), 1.62 (m, 3H), 0.96 (m, 2H), -0.03 (s, 9H).

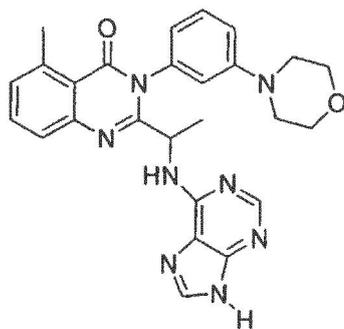
50

5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (156)

55 **[0353]** Paso B: El compuesto 156 se preparó reaccionando el compuesto 157 de acuerdo con el procedimiento para la preparación del compuesto 137 (paso final C).  $m/z = 483$  (M+H). La estructura del compuesto 156 se muestra abajo.

60

65



5

10

5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (156)

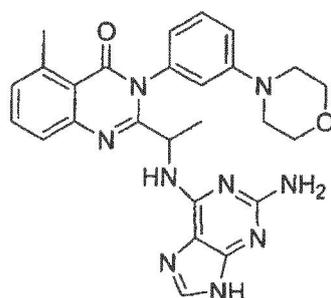
**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (158)**

15

**[0354]** El compuesto 158 se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el compuesto 129 pero el compuesto 133 se usó en lugar del Compuesto **126**.  $m/z = 498$  (M+H). La estructura del compuesto 158 se muestra abajo.

20

25



30

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-metil-3-(3-morfolin-4-il-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (158)

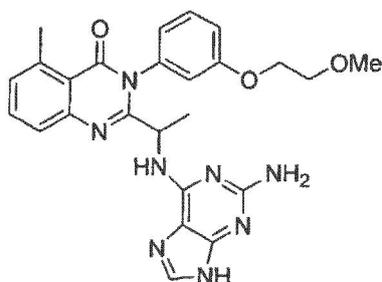
**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(2-metoxi-etoxi)-fenil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (159)**

35

**[0355]** El compuesto 159 se preparó reaccionando el compuesto 133 de acuerdo con el procedimiento para la preparación del compuesto 147.  $m/z = 487$  (M+H). La estructura del compuesto 159 se muestra abajo.

40

45



50

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(2-metoxi-etoxi)-fenil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (159)

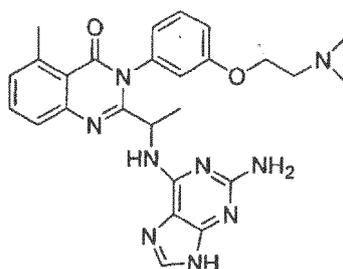
**2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (160)**

55

**[0356]** El compuesto 160 se preparó reaccionando el compuesto 133 de acuerdo con el procedimiento para la preparación del compuesto 146.  $m/z = 500$  (M+H). La estructura del compuesto 160 se muestra abajo.

60

65

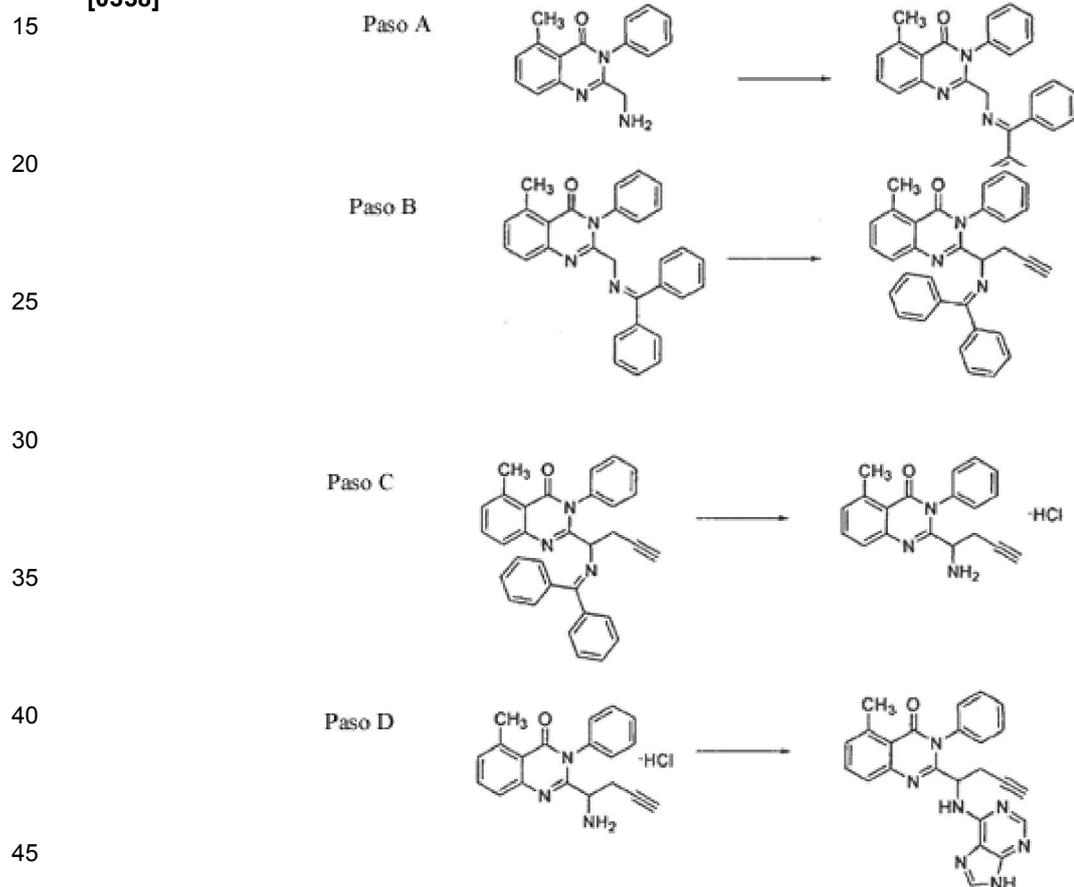


2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-3-[3-(2-dimetilamino-etoxi)-fenil]-5-metil-3H-quinazolin-4-ona (160)

**EJEMPLO 11** (Referencia)**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO**

5 **[0357]** Los compuestos que tienen fórmula general I (mostrada antes) se han preparado de acuerdo con los pasos A-D del esquema sintético titulado "Procedimiento E" mostrado a continuación. El Procedimiento E proporciona un método alternativo adicional de preparar compuestos con una variedad de cadenas laterales unidas al enlace entre los anillos quinazolinona y purina de los compuestos inventivos. Aunque se ilustra un grupo funcional propargil, el método ilustrado en el Procedimiento E es aplicable a muchos grupos funcionales conocidos.

## Procedimiento E

**[0358]****2-[(1-[(2-amino-9H-purin-6-yl)amino]but-3-ynil)-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (161)**

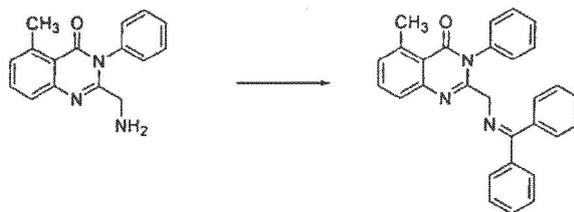
50 **[0359]** El compuesto 161 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-D a continuación.

**2-[(Benzhidriliden-amino)-metil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (162)**

55 **[0360]** Paso A: Se cargó un matraz de fondo redondo, un cuello de 100 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con 2-amino-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (2.91 g, 11.0 mmol), benzhidrilideneamina (2.39 g, 13.2 mmol), y 1,2-dicloroetano (15 mL). La mezcla de la reacción se agitó a reflujo por 4 horas bajo atmósfera de nitrógeno y se enfrió a temperatura ambiente. La concentración bajo presión reducida seguida por purificación por cromatografía de columna logró el compuesto 162 como un sólido naranja. m.p. 49 °C (dec); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.22-7.78 (m, 17H), 6.74 (m, 1H), 4.17 (s, 2H), 2.74 (s, 3H); *m/z* = 430 (M+H). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 162 se muestran a continuación.

60

65



5

2-[(Benzhidridiliden-amino)-but-3-inil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (163)

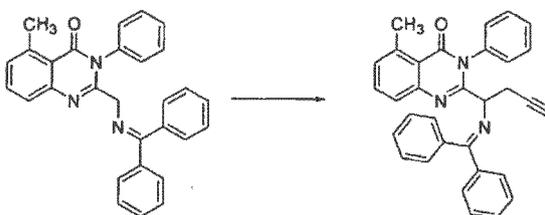
10

**[0361]** Paso B: Se purgó un matraz de fondo redondo de un cuello de 25 mL equipado con un agitador magnético con nitrógeno y se cargó con el compuesto 162 (500 mg, 1.20 mmol), y THF anhidro (4 mL). Se agregó una solución 1M de tert-butóxido de potasio en THF (1.40 mL, 1.40 mmol) en una porción. Luego de agitar por 20 min a temperatura ambiente, 80% se agregó una solución de bromuro de propargil en tolueno (210 mL, 1.89 mmol), y la reacción se agitó un 15 min más a temperatura ambiente. Luego se agregó bicarbonato de sodio acuoso saturado (5 mL), se separaron las capas, y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL) Los extractos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. La purificación del residuo por cromatografía de columna logró el producto como un sólido amarillo  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.72 (m, 2H), 7.29-7.67 (m, 3H), 6.77 (m, 3H), 4.61 (t, 1H,  $J = 7.1$  Hz), 3.01-3.11 (m, 1H), 2.76 (s, 3H), 2.57 (m, 1H), 2.23 (t, 1H,  $J = 2.5$  Hz). La reacción descrita antes y el compuesto intermedio 163 se muestran a continuación.

15

20

25



30

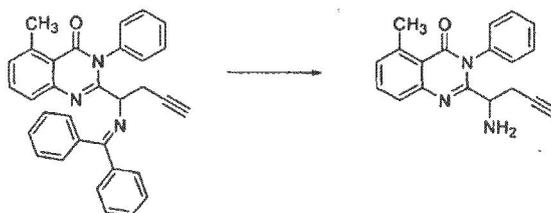
2-(1-amino)-but-3-inil]-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (164)

**[0362]** Paso C: Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 50 mL equipado con un agitador magnético con el compuesto 163 (193 mg, 0.41 mmol), y dietil éter (5 mL). Se agregó una solución 2N de ácido clorhídrico (5 mL) en una porción. Luego de agitar por 1.5 h a temperatura ambiente, se agregó cloruro de sodio (750 mg, 12.8 mmol) a la mezcla de la reacción, y se continuó la agitación por 10 min. El precipitado resultante se filtró, se enjuagó secuencialmente con dietil éter (0.5 mL), 2N ácido clorhídrico (1 mL) y MBE (2 x 1 mL). El secado bajo vacío a 45°C por 2 h logró el producto como un sólido rosa.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.82 (s, 3H), 7.79 (t, 1H,  $J = 7.7$  Hz), 7.41-7.66 (m, 6H), 7.42 (d, 1H,  $J = 7.3$  Hz), 3.91 (s, 1H), 3.11 (m, 1H), 2.87 (m, 1H), 2.75 (s, 3H), 2.54-2.67 (m, 1H). La reacción descrita antes y el Compuesto 164 se muestran abajo.

35

40

45



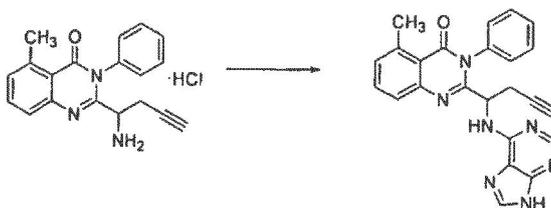
50

5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-but-3-inil]-3H-quinazolin-4-ona (161)

**[0363]** Paso D: El compuesto 161 se preparó reaccionando el compuesto 164 preparado siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto 14 (paso D) usando tres equivalentes de diisopropiletilamina en vez de uno. ESI-MS  $m/z = 422$  ( $\text{MH}^+$ ). La reacción descrita antes y el compuesto 161 se muestran a continuación.

55

60



2-[1-(2-amino-(9H-purin-6-ilamino)-but-3-inil]-5-metil-3 fenil-3H-quinazolin--4-ona (165)

**[0364]** El Compuesto 165 se preparó usando el procedimiento general descrito antes con respecto al compuesto 161, pero se sustituyó 2-amino-6-bromopurina por 6-bromopurina en el paso D. ESI-MS  $m/z$  437 ( $MH^+$ ).

5

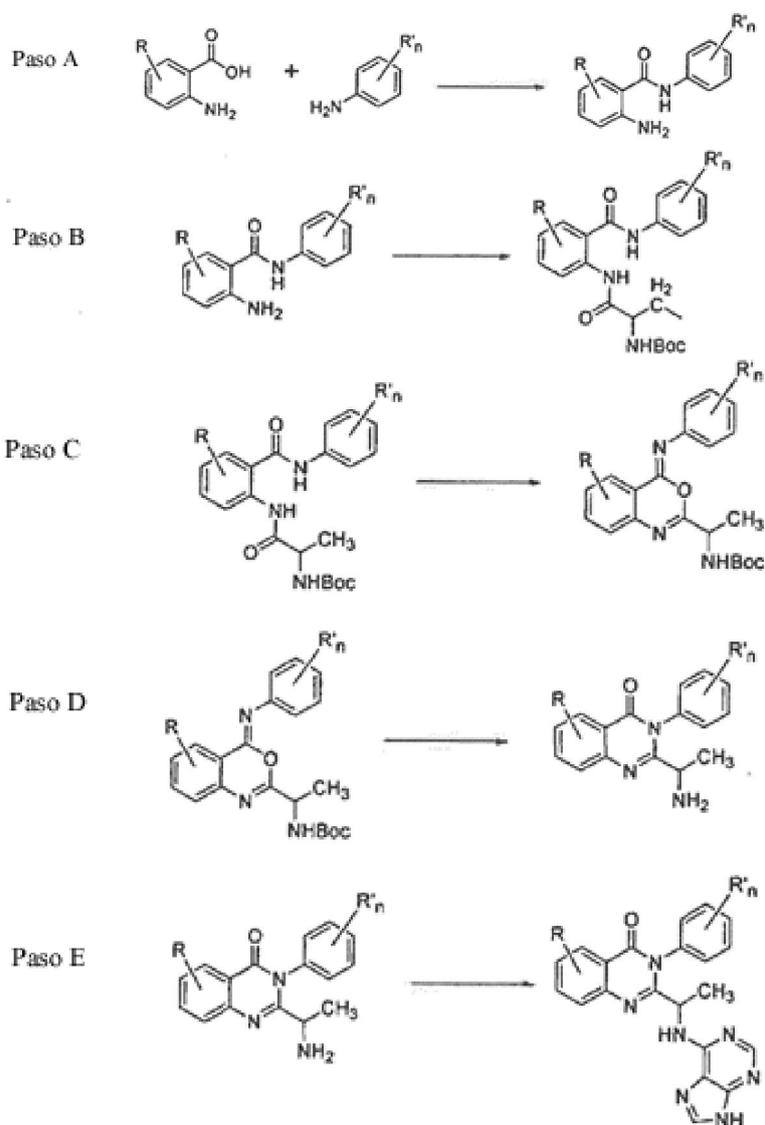
**EJEMPLO 12** (Referencia)

PREPARACIÓN DEL COMPUESTO

**[0365]** Los compuestos que tienen fórmula general I (mostrada antes) se han preparado de acuerdo con los pasos A-E del esquema sintético titulado "Procedimiento K" mostrado a continuación. El procedimiento K proporciona un método alternativo adicional de preparar tales compuestos vía un intermedio oxacina (paso C). Procedimiento K

**[0366]**

15



20

25

30

35

40

45

50

55

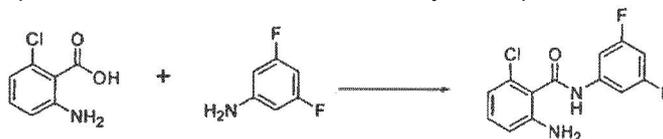
5-cloro-3-(3,5-difluoro-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (166)

**[0367]** El compuesto 166 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-E a continuación.

2-amino-6-cloro-N-(3,5-difluoro-fenil)-benzamida (167)

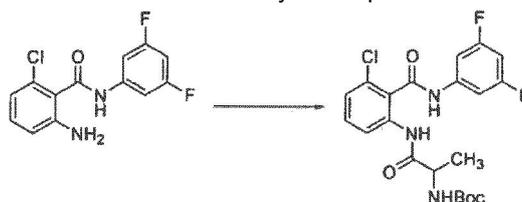
65

**[0368]** Paso A: [0298] El Compuesto 167 se preparó siguiendo el procedimiento para la preparación del compuesto 15 (paso A), pero se substituyó ácido 2-amino-6-clorobenzoico por ácido 2-amino-6-metilbenzoico y 3,5-fluoroanilina fue substituida por anilina. La reacción descrita antes y el compuesto 167 se muestran a continuación.



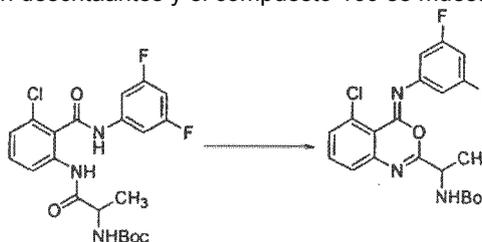
**Tert-butil éster de ácido {1-[3-cloro-2-(3,5-difluoro-fenilcarbamoil)-fenilcarbamoil]-etil}-carbámico (168)**

**[0369]** Paso B: Se cargó un matraz de fondo redondo de un cuello de 100 mL equipado con un agitador magnético y condensador de reflujo con el compuesto 167 (10.6 mmol), *N-tert*-butiloxycarbonil-D,L-alanina *N*-hidroxisuccinimida éster (3.64 g, 12.7 mmol), 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (710 mg, 5.82 mmol) y tamices moleculares de 4Å (3.00 g). El matraz se purgó con nitrógeno, y se agregó tolueno anhidro (15 mL) y *N,N*-diisopropiletilamina (1.64 g, 2.22 mmol). La mezcla de la reacción se calentó a 90 °C por 7 h y la suspensión resultante se filtró caliente. La concentración del filtrado bajo presión reducida logró un sólido marrón claro, el cual se purificó por cromatografía de columna (gel de sílice, EtOAc/hexanos). Esto logró un rendimiento del 86% del compuesto 168 como un sólido blanco. m.p. 194-196 °C (dec.); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 10.96 (s, 1H), 9.46 (s, 1H), 7.84 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.51-7.36 (m, 4H), 7.19 (d, 1H, *J* = 6.8 Hz), 6.99 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 4.10 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 1.31 (s, 9H), 1.16 (d, 3H, *J* = 6.9 Hz); *m/z* = 454 (M+H). La reacción descrita antes y el compuesto 168 se muestran a continuación.



**éster tert-butil de ácido {1-[5-cloro-4-(3,5-difluoro-fenilimino)-4H-benzo[d][1,3]oxacin-2-il]-etil}-carbámico (169)**

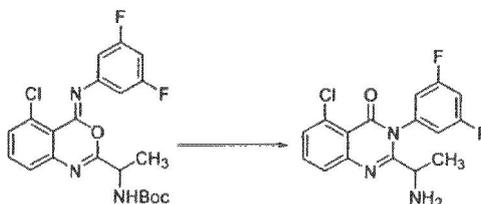
**[0370]** Paso C: Se purgó un matraz de fondo redondo, tres cuellos de 100 mL equipado con un agitador magnético y termómetro con nitrógeno y se cargó con el compuesto 168 (3.30 mmol), cloruro de metileno anhidro (25 mL), *N,N*-diisopropiletilamina (4.60 g, 35.7 mmol) y trifetilfosfina (3.98 g, 15.2 mmol). La mezcla de la reacción se enfrió luego a 0-5°C en un baño de hielo/agua. Luego se añadió yoduro (3.61 g, 14.2 mmol) en porciones a la mezcla de la reacción en 1 h. Una vez que se completó la adición, se removió el baño de enfriamiento, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente por 30 min más. La reacción se refrescó con 10% de carbonato de potasio acuoso (25 mL), se separó la capa orgánica, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y concentró bajo presión reducida. La cromatografía de columna del sólido resultante (gel de sílice, EtOAc/hexanos) dio un rendimiento del 52% del compuesto 169 como un sólido blanco. m.p. 117-118 °C; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 7.72-7.60 (m, 2H), 7.42 (dd, 1H, *J* = 7.6 Hz, 1.3 Hz), 7.31 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz), 6.95 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 6.82 (m, 2H), 4.27 (m, 1H), 1.33 (s, 9H), 1.28 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz); *m/z* = 436 (M+H). La reacción descrita antes y el compuesto 169 se muestran a continuación.



**2-(1-amino-etil)-5-cloro-3-(3,5-difluoro-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (170)**

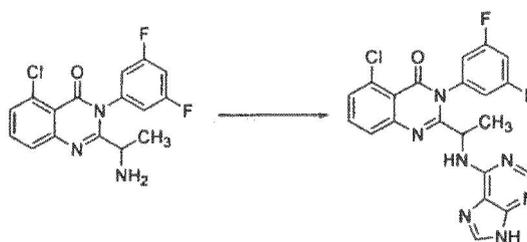
**[0371]** Paso D: Una solución del compuesto 169 (1.68 mmol) en piperidina (2 mL) se agitó por 3 h a temperatura ambiente. La evaporación de la mezcla de la reacción a sequedad bajo alto vacío dio una espuma amarilla. Esta espuma se disolvió en una solución 4M de cloruro de hidrógeno en 1,4-dioxano (4 mL) y se agitó por 17 h a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se concentró a sequedad, se alcalinizó con 10% carbonato de potasio acuoso (40 mL) y se extrajo con MTBE (3 x 20 mL). Combinar los extractos orgánicos, secando sobre sulfato de sodio y concentrando a sequedad logró un residuo sólido. Este residuo se disolvió en *d*-cloroformo (5 mL) y se calentó por 15 h a 50°C. Luego de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de la reacción se enjuagó con agua (3

x 10 mL), se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó a sequedad, logrando un rendimiento del 98% del compuesto 170 como un sólido blanco. m.p. 200-202 °C;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7.65 (m, 2H), 7.49 (m, 1H), 7.01 (t, 1H,  $J = 6.6$  Hz), 6.89 (m, 2H), 3.68 (m, 1H), 1.33 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz), 1.25 (s, 2H);  $m/z = 336$  (M+H). La reacción descrita antes y el compuesto 170 se muestran a continuación.



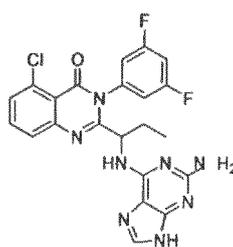
5  
10  
15 5-cloro-3-(3,5-difluoro-fenil)-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (166)

**[0372]** Paso E: El compuesto 166 se preparó reaccionando el compuesto 170 de acuerdo con el procedimiento para la preparación del compuesto 107 (procedimiento final). ESI-MS  $m/z$  454.3 ( $\text{MH}^+$ ). La reacción descrita antes y el compuesto 166 se muestran a continuación.



25  
30 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-5-cloro-3-(3,5-difluoro-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (171)

**[0373]** El compuesto 171 se preparó siguiendo el procedimiento general para el compuesto 161 (pasos A-E), pero éster de ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-butírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il se sustituyó por éster de N-tert-butiloxycarbonil-D,L-alanina N-hidroxisuccinimida en el paso B, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el pas E. ESI-MS  $m/z$  459.3 ( $\text{MH}^+$ ). La estructura del compuesto 171 se muestra abajo.

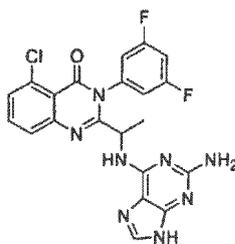


(171)

40  
45  
50  
55 2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-etil]-5-cloro-3-(3,5-difluoro-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (172)

**[0374]** El compuesto 17 se preparó siguiendo el procedimiento general para el compuesto 161 (pasos A-E), pero 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso E. La estructura del compuesto 172 se muestra a continuación.

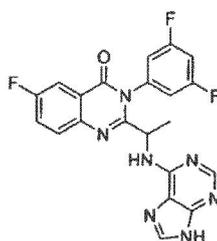
60  
65



(172)

3-(3,5-difluoro-fenil-6-fluoro-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (173)

**[0375]** El Compuesto 173 se preparó siguiendo el procedimiento general para el compuesto 161 (pasos A-E), pero se sustituyó ácido 2-amino-5-fluorobenzoico por ácido 2-amino-6-clorobenzoico en el paso A. ESI-MS  $m/z$  438.2 ( $MH^+$ ). La estructura del compuesto 173 se muestra abajo.



(173)

5-cloro-3-(2,6-difluoro-fenil-2-[1-(9H-purin-6-ilamino)-propil]-3H-quinazolin-4-ona (174)

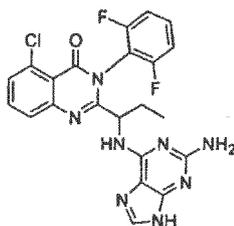
**[0376]** El compuesto 174 se preparó siguiendo el procedimiento general para el compuesto 161 (pasos A-E), pero 2,6-difluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A y ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-butírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il éster por N-tert-butoxicarbonil-D,L-anilina N-hidroxisuccinimida éster en el paso B. ESI-MS  $m/z$  468.2 ( $MH^+$ ). La estructura del compuesto 174 se muestra abajo.



(174)

2-[1-(2-amino-9H-purin-6-ilamino)-propil]-5-cloro-3-(2,6-difluoro-fenil)-3H-quinazolin-4-ona (175)

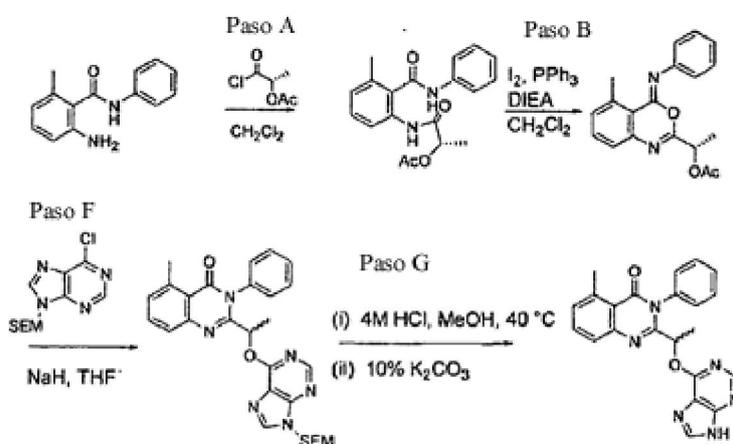
**[0377]** El compuesto 175 se preparó siguiendo el procedimiento general para el compuesto 161 (pasos A-E), pero 2,6-difluoroanilina se sustituyó por anilina en el paso A, éster de ácido 2-tert-butoxicarbonilamino-butírico 2,5-dioxo-pirrolidin-1-il se sustituyó por éster de N-tert-butoxicarbonil-D,L-alanina N-hidroxisuccinimida en el paso B, y 2-amino-6-bromopurina se sustituyó por 6-bromopurina en el paso E. ESI-MS  $m/z$  483.2 ( $MH^+$ ). La estructura del compuesto 175 se muestra abajo.



(175)

**EJEMPLO 13** (Referencia)**PREPARACIÓN DEL COMPUESTO**

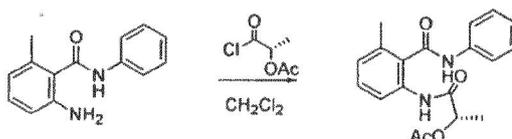
**[0378]** Los compuestos que tienen fórmula general I (mostrada antes) se han preparado de acuerdo con los pasos A-G del esquema sintético titulado "Procedimiento L" mostrado a continuación.

5-metil-3-fenil--2-[1-(9H-purin--6-iloxi)-etil]-3H-quinazolin--4-ona (176)

**[0379]** El compuesto 176 se preparó de acuerdo con los procedimientos establecidos en los pasos A-G a continuación.

ácido acético 1-(3-metil-2-fenilcarbamoil-fenilcarbamoil)-etil éster (177)

**[0380]** Paso A: Se agregó (S)-2-acetoxipropionil cloruro (5.469 g, 36.32 mmol) a una solución del compuesto 15 (6.788 g, 30 mmol) en diclorometano (150 mL). Inmediatamente se formó un precipitado. La reacción se agitó por 25h y el precipitado se filtró. El filtrado se enjuagó con solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (3 x 50 mL) y se secó (MgSO<sub>4</sub>). La filtración y concentración del filtrado dio un sólido marrón (7.6 g). La purificación por cromatografía flash (1:2 EtOAc:hexanos-> EtOAc->10:1 EtOAc:MeOH) seguida por recristalización de las fracciones impuras de los EtOAc:hexanos dio el Compuesto 177 como un sólido. ESI-MS m/z = 341 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 177 se muestran a continuación.

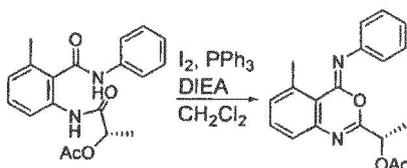
ácido acético 1-(5-metil-4-fenilimino-4H-benzo[d][1,3]oxacin-2-il)-etil éster (178)

**[0381]** Paso B: El Compuesto 177 (0.34 g, 1.0 mmol) se disolvió en diclorometano (25 mL). Se agregó trifetilfosfina (1.311 g, 5 mmol) a la solución, seguido por yoduro (1.269 g, 5 mmol) y DIEA (1.9 mL, 11 mmol). La reacción se tapó y agitó por 4 días. La reacción se refrescó con la adición de solución de bicarbonato de sodio acuoso

saturado (25 mL). La capa orgánica se separó, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar una goma marrón oscura (2.886 g). La purificación por cromatografía flash (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) dio el compuesto imino-1,3-oxacin 178 como un aceite amarillo. ESI-MS m/z = 323 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 178 se muestra abajo.

5

10



ácido acético 1-metil-2-(3-metil-2-fenilcarbamoil-fenilimino)-2-piperidin-1-il-etil éster (179)

15

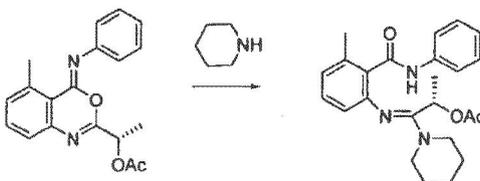
**[0382]** Paso C: Se agregó piperidina (1 mL) al compuesto 178 (0.161 g, 0.5 mmol) y la mezcla de la reacción se agitó por 19.5 h. La mezcla de la reacción se concentró bajo presión reducida para dar una goma amarilla. La

20

trituration con 1:4 EtOAc:hexanos dio una pequeña cantidad del compuesto 179 (0,041 g). La cromatografía flash (1:4 EtOAc:hexanos) del filtrado dio solo una mezcla parcialmente separable de los productos esperados, la acetoxiquinazolinona del compuesto 179 y la hidroxiquinazolinona (masa total 0.122 g). ESI-MS m/z = 408 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 179 se muestran abajo.

25

30



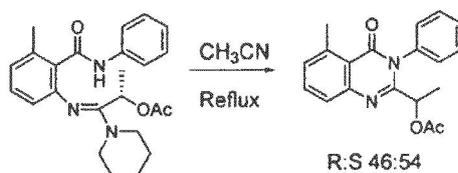
ácido acético 1-(5-metil-4-oxo-3-fenil-3,4-dihidroquinazolin-2-il)etil éster (180)

35

**[0383]** Paso D: El compuesto 179 (0.037 g, 0.09 mmol) se disolvió en acetonitrilo (10 mL) y la mezcla de la reacción se calentó a reflujo por 3 h. El solvente se removió bajo presión reducida y el residuo se disolvió en una mezcla de acetato de etilo (10 mL) y 1M HCl (5 mL). Luego de separar la capa acuosa, la capa orgánica se enjuagó con 1M HCl adicional (2 x 5 mL), solución de bicarbonato de sodio acuoso saturado (3 x 5 mL), agua (2 x 5 mL) y salmuera saturada (5 mL). La solución se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto 180. ESI-MS m/z = 323 (MH<sup>+</sup>). El producto se había racemizado casi totalmente a este punto (la pureza quiral fue 46:54 S:R). La reacción descrita antes y el compuesto 180 se muestran a continuación.

40

45



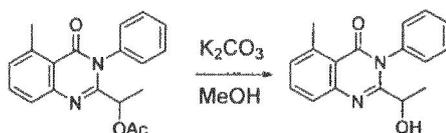
2-(1-hidroxi-etil)-5-metil-3-fenil-3H-quinazolin-4-ona (181)

50

**[0384]** Paso E: El Compuesto 180 (0.011 g, 0.034 mmol) se disolvió en metanol (2 mL) y se agregó carbonato de potasio (0.012 g, 0.085 mmol). La mezcla de la reacción se agitó por 20 min, y se agregó agua (20 mL). La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 mL) y los orgánicos combinados se enjuagaron con salmuera saturada (10 mL). La solución se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida para dar el compuesto 181. ESI-MS m/z = 281 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 181 se muestran a continuación.

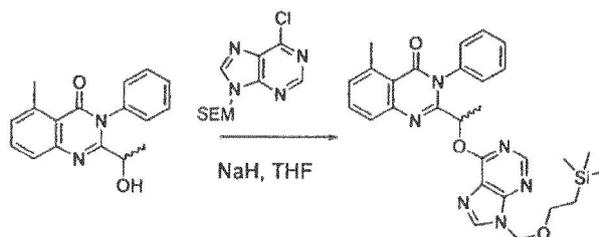
55

60



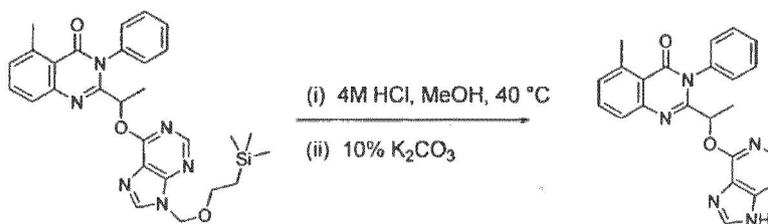
5-metil-3-fenil-2-[1-(9-(2-trimetilsilanil-etoximetil)-9H-purin-6-iloxi)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (182)

**[0385]** Paso F: Una solución del compuesto 181 (0.069 g, 0.25 mmol) en THF (5 mL) se trató con hidruro de sodio (0.007 g, 0.27 mmol) y se agitó por 10 min. Una solución del compuesto intermedio 13 (0.077 g, 0.27 mmol) en THF (1 mL) se agregó a la mezcla de la reacción. El matraz que originalmente contenía el compuesto intermedio 13 se enjuagó con THF adicional (1 mL) y el enjuagado también se agregó a la mezcla de la reacción. A la reacción se le permitió proceder, y se agregó hidruro de sodio adicional (0.005 g, 0.21 mmol) a 21.5 h y 23 h. La reacción se refrescó luego de un total de 24h con la adición de solución de cloruro de amonio saturado (5 mL). La mezcla se extrajo con diclorometano (3 x 5 mL) y los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>. Luego de la filtración, el filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía flash (1:1 EtOAc:hexanos -> 3:2 EtOAc:hexanos) para dar el compuesto 182. ESI-MS m/z = 529 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 182 se muestran a continuación.



#### 5-metil-3-fenil-2-[1-(9H-purin-6-iloxi)-etil]-3H-quinazolin-4-ona (176)

**[0386]** El Compuesto 182 (0.053 g, 0.1 mmol) se disolvió en 2M metilamina en metanol (2 mL) y 4M HCl (2 mL). La mezcla se agitó y calentó a 40°C por 3h. La mezcla de la reacción se retiró de la fuente de calor y se le permitió enfriar. La mezcla de la reacción se filtró a través de un tapón de papel filtro de GFA (fibra de vidrio) y el filtrado se concentró para remover solo el metanol. El residuo se ajustó a pH 10 por la adición de solución 10% carbonato de potasio. El sólido resultante se recolectó por filtración y se purificó por RT-HPLC (C18 columna Luna, 10x250 mm, 4.7 mL/min, 10-90% CH<sub>3</sub>CH en agua en 18 min, con todos los solventes conteniendo 0.05% ácido fórmico) para dar el compuesto 176 como un sólido blanco esponjoso luego de la liofilización. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, d<sub>6</sub>-DMSO) δ 13.40, br s, 1H; 8.40, s, 1H; 8.35, s, 1H; 7.66, t, J = 7.8 Hz, 1H; 7.48 - 7.58, m, 4H; 7.31-7.36, m, 2H; 7.20 - 7.23, m, 1H; 5.65, q, J = 6.6 Hz, 1H; 2.73, s, 3H; 1.65, d, J = 6.6 Hz, 3H. ESI-MS m/z = 399 (MH<sup>+</sup>). La reacción descrita antes y el compuesto 176 se muestran a continuación.



#### EJEMPLO 14

##### **Ensayos bioquímicos de potencia y selectividad de la PI3K**

##### **Ensayo bioquímico usando 20 mM ATP**

**[0387]** Usando el método descrito en el Ejemplo 2, se evaluó la actividad inhibitoria y potencia de los compuestos de la invención contra la PI3K $\delta$ , y la selectividad por la PI3K $\delta$  versus otras isozimas Clase I de la PI3K. En la Tabla I, se dan los valores IC<sub>50</sub> (mM) para la PI3K $\delta$  ("Delta"), y pueden calcularse para las otras isoformas usando los cocientes de los valores IC<sub>50</sub> discutidos abajo. Para ilustrar la selectividad de los compuestos, los cocientes de los valores IC<sub>50</sub> de los compuestos para PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$ , y PI3K $\gamma$  en relación con PI3K $\delta$  se dan, respectivamente, como "Cociente Alfa/Delta", "Cociente Beta/Delta" y "Cociente Gamma/Delta".

**[0388]** Los ensayos iniciales de selectividad se realizaron idénticamente al protocolo del ensayo de selectividad en el Ejemplo 2, excepto usando 100 mL Ecoscint para la detección de la radiomarca. Los ensayos posteriores de selectividad se hicieron similarmente usando los mismos stocks de sustrato 3X excepto que contenían 0.05 mCi/mL  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]ATP y 3 mM PIP2. Los ensayos de selectividad posteriores también usaron los mismos stocks de enzima 3X, excepto que ahora contenían 3 nM de cualquier isoforma dada de la PI3K.

**[0389]** Para todos los ensayos de selectividad, los compuestos de la prueba se pesaron y disolvieron en stocks de 10-50 mM en 100% DMSO (dependiendo de sus respectivas solubilidades) y se almacenaron a -20°C. Los

compuestos se descongelaron (a temperatura ambiente o 37°C), se diluyeron a 300 mM en agua a partir de lo cual se hizo una serie de dilución 3 veces en agua. A partir de estas diluciones, se agregaron 20 mL en los platillos del ensayo junto a blancos de agua usados para el control de la enzima (positivo) y el control de no enzima (fondo). El resto del ensayo se realizó esencialmente de acuerdo con el protocolo del ensayo de selectividad en el Ejemplo 2.

5

**TABLA 1**

	Delta IC <sub>50</sub> (nM)	Alfa-Delta Proporción	Beta-Delta Proporción	Gamma-Delta Proporción	Elastasa de PMN humanos EC <sub>50</sub> (nM)	B humanos Linfocito EC <sub>50</sub> (nM)	
10	Compuesto 117	12	662	78	67	382	1.6
15	Compuesto 98	16	608	74	66	84	4.6
	Compuesto 107	9	248	49	21	119	6.1
	Compuesto 174	45	250	72	38	298	30.7
20	Compuesto 93	26	721	94	62	584	

EJEMPLO 15

25 Datos del ensayo celular para la actividad de los inhibidores de la PI3Kδ

[0390] Usando el método descrito en el Ejemplo 2, se evaluó la actividad inhibitoria y potencia de los compuestos de la invención en un ensayo de liberación de elastasa de neutrófilos (PMN). Los datos de estos ensayos se establecen en la Tabla 1. En la Tabla 1: los valores mostrados son concentraciones efectivas del compuestos (EC<sub>50</sub>; mM).

30

[0391] Aunque la presente invención se ha descrito con referencia específica a ciertos contextos preferidos, pueden practicarse modificaciones posteriores dentro del alcance de la invención en cuanto se define en las declaraciones a continuación. Por consiguiente, no deben colocarse limitaciones en la invención distintas a las específicamente recitadas en las declaraciones.

35

LISTADO DE SECUENCIA

[0392]

40 <110> Corporación ICOS

<120> QUINAZOLINONAS COMO INHIBIDORES DE LA FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA DELTA HUMANA

<130> E21395EPA

45 <140> 13150110.8

<141> 5-12-2005

(150) 60:570,784.

<151> 5-13-2004

50

<160> 6

<170> Patente version 3.0

55 <210> 1

<211> 5220

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223>cDNA completo p110delta humano

<220>

<221> CDS

65 <222> (196)..(3327).

<400> 1

ES 2 605 792 T3

cagtcgctcc gagcggccgc gagcagagcc gccagccct gtcagctgcg ccgggacgat 60  
 5 aaggagtcag gccagggcgg gatgacactc attgattcta aagcatcttt aatctgccag 120  
 gcggaggggg ctttgctggt ctttcttggga ctattccaga gaggacaact gtcactctggg 180  
 10 aagtaacaac gcagg atg ccc cct ggg gtg gac tgc ccc atg gaa ttc tgg 231  
                   Met Pro Pro Gly Val Asp Cys Pro Met Glu Phe Trp  
                   1                  5                  10  
 15 acc aag gag gag aat cag agc gtt gtg gtt gac ttc ctg ctg ccc aca 279  
 Thr Lys Glu Glu Asn Gln Ser Val Val Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr  
                   15                  20                  25  
 20 ggg gtc tac ctg aac ttc cct gtg tcc cgc aat gcc aac ctc agc acc 327  
 Gly Val Tyr Leu Asn Phe Pro Val Ser Arg Asn Ala Asn Leu Ser Thr  
                   30                  35                  40  
 25 atc aag cag ctg ctg tgg cac cgc gcc cag tat gag ccg ctc ttc cac 375  
 Ile Lys Gln Leu Leu Trp His Arg Ala Gln Tyr Glu Pro Leu Phe His  
                   45                  50                  55                  60  
 30 atg ctc agt ggc ccc gag gcc tat gtg ttc acc tgc atc aac cag aca 423  
 Met Leu Ser Gly Pro Glu Ala Tyr Val Phe Thr Cys Ile Asn Gln Thr  
                   65                  70                  75  
 35 gcg gag cag caa gag ctg gag gac gag caa cgg cgt ctg tgt gac gtg 471  
 Ala Glu Gln Gln Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Arg Leu Cys Asp Val  
                   80                  85                  90  
 40 cag ccc ttc ctg ccc gtc ctg cgc ctg gtg gcc cgt gag ggc gac cgc 519  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ES 2 605 792 T3

	Gln	Pro	Phe	Leu	Pro	Val	Leu	Arg	Leu	Val	Ala	Arg	Glu	Gly	Asp	Arg	
			95					100					105				
5	gtg	aag	aag	ctc	atc	aac	tca	cag	atc	agc	ctc	ctc	atc	ggc	aaa	ggc	567
	Val	Lys	Lys	Leu	Ile	Asn	Ser	Gln	Ile	Ser	Leu	Leu	Ile	Gly	Lys	Gly	
		110					115					120					
10	ctc	cac	gag	ttt	gac	tcc	ttg	tgc	gac	cca	gaa	gtg	aac	gac	ttt	cgc	615
	Leu	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Leu	Cys	Asp	Pro	Glu	Val	Asn	Asp	Phe	Arg	
	125					130					135					140	
15	gcc	aag	atg	tgc	caa	ttc	tgc	gag	gag	gcg	gcc	gcc	cgc	cgg	cag	cag	663
	Ala	Lys	Met	Cys	Gln	Phe	Cys	Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Gln	Gln	
					145					150					155		
20	ctg	ggc	tgg	gag	gcc	tgg	ctg	cag	tac	agt	ttc	ccc	ctg	cag	ctg	gag	711
	Leu	Gly	Trp	Glu	Ala	Trp	Leu	Gln	Tyr	Ser	Phe	Pro	Leu	Gln	Leu	Glu	
				160					165					170			
25	ccc	tcg	gct	caa	acc	tgg	ggg	cct	ggt	acc	ctg	cgg	ctc	ccg	aac	cgg	759
	Pro	Ser	Ala	Gln	Thr	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Arg	Leu	Pro	Asn	Arg	
			175					180					185				
30	gcc	ctt	ctg	gtc	aac	gtt	aag	ttt	gag	ggc	agc	gag	gag	agc	ttc	acc	807
	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Val	Lys	Phe	Glu	Gly	Ser	Glu	Glu	Ser	Phe	Thr	
		190					195					200					
35	ttc	cag	gtg	tcc	acc	aag	gac	gtg	ccg	ctg	gcg	ctg	atg	gcc	tgt	gcc	855
	Phe	Gln	Val	Ser	Thr	Lys	Asp	Val	Pro	Leu	Ala	Leu	Met	Ala	Cys	Ala	
	205					210					215					220	
40	ctg	cgg	aag	aag	gcc	aca	gtg	ttc	cgg	cag	ccg	ctg	gtg	gag	cag	ccg	903
	Leu	Arg	Lys	Lys	Ala	Thr	Val	Phe	Arg	Gln	Pro	Leu	Val	Glu	Gln	Pro	
					225					230					235		
45	gaa	gac	tac	acg	ctg	cag	gtg	aac	ggc	agg	cat	gag	tac	ctg	tat	ggc	951
	Glu	Asp	Tyr	Thr	Leu	Gln	Val	Asn	Gly	Arg	His	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Gly	
			240					245					250				
50	aac	tac	ccg	ctc	tgc	cag	ttc	cag	tac	atc	tgc	agc	tgc	ctg	cac	agt	999
	Asn	Tyr	Pro	Leu	Cys	Gln	Phe	Gln	Tyr	Ile	Cys	Ser	Cys	Leu	His	Ser	
			255					260					265				
55	ggg	ttg	acc	cct	cac	ctg	acc	atg	gtc	cat	tcc	tcc	tcc	atc	ctc	gcc	1047
	Gly	Leu	Thr	Pro	His	Leu	Thr	Met	Val	His	Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Ala	
		270					275					280					
60	atg	cgg	gat	gag	cag	agc	aac	cct	gcc	ccc	cag	gtc	cag	aaa	ccg	cgt	1095
	Met	Arg	Asp	Glu	Gln	Ser	Asn	Pro	Ala	Pro	Gln	Val	Gln	Lys	Pro	Arg	
	285					290					295				300		
65	gcc	aaa	cca	cct	ccc	att	cct	gcg	aag	aag	cct	tcc	tct	gtg	tcc	ctg	1143
	Ala	Lys	Pro	Pro	Pro	Ile	Pro	Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	
				305						310					315		
70	tgg	tcc	ctg	gag	cag	ccg	ttc	cgc	atc	gag	ctc	atc	cag	ggc	agc	aaa	1191
	Trp	Ser	Leu	Glu	Gln	Pro	Phe	Arg	Ile	Glu	Leu	Ile	Gln	Gly	Ser	Lys	
				320					325					330			
75	gtg	aac	gcc	gac	gag	cgg	atg	aag	ctg	gtg	gtg	cag	gcc	ggg	ctt	ttc	1239
	Val	Asn	Ala	Asp	Glu	Arg	Met	Lys	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Leu	Phe	
			335					340					345				



ES 2 605 792 T3

gac gat gag ctg ttc cag tac ctg ctg cag ctg gtg cag gtg ctc aag 2055  
 Asp Asp Glu Leu Phe Gln Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys  
 605 610 615 620

5      tac gag tcc tac ctg gac tgc gag ctg acc aaa ttc ctg ctg gac cgg 2103  
 Tyr Glu Ser Tyr Leu Asp Cys Glu Leu Thr Lys Phe Leu Leu Asp Arg  
 625 630 635

10      gcc ctg gcc aac cgc aag atc ggc cac ttc ctt ttc tgg cac ctc cgc 2151  
 Ala Leu Ala Asn Arg Lys Ile Gly His Phe Leu Phe Trp His Leu Arg  
 640 645 650

15      tcc gag atg cac gtg ccg tcg gtg gcc ctg cgc ttc ggc ctc atc ctg 2199  
 Ser Glu Met His Val Pro Ser Val Ala Leu Arg Phe Gly Leu Ile Leu  
 655 660 665

20      gag gcc tac tgc agg ggc agc acc cac cac atg aag gtg ctg atg aag 2247  
 Glu Ala Tyr Cys Arg Gly Ser Thr His His Met Lys Val Leu Met Lys  
 670 675 680

25      cag ggg gaa gca ctg agc aaa ctg aag gcc ctg aat gac ttc gtc aag 2295  
 Gln Gly Glu Ala Leu Ser Lys Leu Lys Ala Leu Asn Asp Phe Val Lys  
 685 690 695 700

30      ctg agc tct cag aag acc ccc aag ccc cag acc aag gag ctg atg cac 2343  
 Leu Ser Ser Gln Lys Thr Pro Lys Pro Gln Thr Lys Glu Leu Met His  
 705 710 715

35      ttg tgc atg cgg cag gag gcc tac cta gag gcc ctc tcc cac ctg cag 2391  
 Leu Cys Met Arg Gln Glu Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Gln  
 720 725 730

40      tcc cca ctc gac ccc agc acc ctg ctg gct gaa gtc tgc gtg gag cag 2439  
 Ser Pro Leu Asp Pro Ser Thr Leu Leu Ala Glu Val Cys Val Glu Gln  
 735 740 745

45      tgc acc ttc atg gac tcc aag atg aag ccc ctg tgg atc atg tac agc 2487  
 Cys Thr Phe Met Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser  
 750 755 760

50      aac gag gag gca ggc agc ggc ggc agc gtg ggc atc atc ttt aag aac 2535  
 Asn Glu Glu Ala Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn  
 765 770 775 780

55      ggg gat gac ctc cgg cag gac atg ctg acc ctg cag atg atc cag ctc 2583  
 Gly Asp Asp Leu Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu  
 785 790 795

60      atg gac gtc ctg tgg aag cag gag ggg ctg gac ctg agg atg acc ccc 2631  
 Met Asp Val Leu Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro  
 800 805 810

65      tat ggc tgc ctc ccc acc ggg gac cgc aca ggc ctc att gag gtg gta 2679  
 Tyr Gly Cys Leu Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val  
 815 820 825

70      ctc cgt tca gac acc atc gcc aac atc caa ctc aac aag agc aac atg 2727  
 Leu Arg Ser Asp Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met  
 830 835 840

75      gca gcc aca gcc gcc ttc aac aag gat gcc ctg ctc aac tgg ctg aag 2775  
 Ala Ala Thr Ala Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys

ES 2 605 792 T3

	845		850		855		860		
5	tcc aag aac ccg ggg gag gcc ctg gat cga gcc att gag gag ttc acc 2823								
	Ser Lys Asn Pro Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr	865		870		875			
10	ctc tcc tgt gct ggc tat tgt gtg gcc aca tat gtg ctg ggc att ggc 2871								
	Leu Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly	880		885		890			
15	gat cgg cac agc gac aac atc atg atc cga gag agt ggg cag ctg ttc 2919								
	Asp Arg His Ser Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe	895		900		905			
20	cac att gat ttt ggc cac ttt ctg ggg aat ttc aag acc aag ttt gga 2967								
	His Ile Asp Phe Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly	910		915		920			
25	atc aac cgc gag cgt gtc cca ttc atc ctc acc tat gac ttt gtc cat 3015								
	Ile Asn Arg Glu Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val His	925		930		935		940	
30	gtg att cag cag ggg aag act aat aat agt gag aaa ttt gaa cgg ttc 3063								
	Val Ile Gln Gln Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu Arg Phe	945		950		955			
35	cgg ggc tac tgt gaa agg gcc tac acc atc ctg cgg cgc cac ggg ctt 3111								
	Arg Gly Tyr Cys Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg His Gly Leu	960		965		970			
40	ctc ttc ctc cac ctc ttt gcc ctg atg cgg gcg gca ggc ctg cct gag 3159								
	Leu Phe Leu His Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala Gly Leu Pro Glu	975		980		985			
45	ctc agc tgc tcc aaa gac atc cag tat ctc aag gac tcc ctg gca ctg 3207								
	Leu Ser Cys Ser Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala Leu	990		995		1000			
50	ggg aaa aca gag gag gag gca ctg aag cac ttc cga gtg aag ttt 3252								
	Gly Lys Thr Glu Glu Glu Ala Leu Lys His Phe Arg Val Lys Phe	1005		1010		1015			
55	aac gaa gcc ctc cgt gag agc tgg aaa acc aaa gtg aac tgg ctg 3297								
	Asn Glu Ala Leu Arg Glu Ser Trp Lys Thr Lys Val Asn Trp Leu	1020		1025		1030			
60	gcc cac aac gtg tcc aaa gac aac agg cag tagtggtcc tcccagccct 3347								
	Ala His Asn Val Ser Lys Asp Asn Arg Gln	1035		1040					
65	gggccaaga ggaggcggct gcgggtcgtg gggaccaagc acattggtcc taaaggggct 3407								
	gaagagcctg aactgcacct aacgggaaag aaccgacatg gctgcctttt gtttacctg 3467								
	gttatttatt tatgacttga aatagttaa ggagctaac agccataaac ggaaacgcct 3527								
	ccttcattca gggggcgtgc tgggcccccc gaggtgcac ctggctctcg gctgaggatt 3587								
	gtcaccceaa gtcttcagc tgggtgatct gggcccagca aagactgttc tcctcccag 3647								
	ggaaccttct tcccaggcct cccgccagac tgctgggtc ctggcgctg gcggtcacct 3707								
	ggtgcctact gtccgacagg atgcctcgat cctogtgcca cccaccctgt gtatcctccc 3767								



ES 2 605 792 T3

5 Asn Gln Ser Val Val Val Asp Phe Leu Leu Pro Thr Gly Val Tyr Leu  
20 25 30

Asn Phe Pro Val Ser Arg Asn Ala Asn Leu Ser Thr Ile Lys Gln Leu  
35 40 45

10 Leu Trp His Arg Ala Gln Tyr Glu Pro Leu Phe His Met Leu Ser Gly  
50 55 60

Pro Glu Ala Tyr Val Phe Thr Cys Ile Asn Gln Thr Ala Glu Gln Gln  
65 70 75 80

15 Glu Leu Glu Asp Glu Gln Arg Arg Leu Cys Asp Val Gln Pro Phe Leu  
85 90 95

20 Pro Val Leu Arg Leu Val Ala Arg Glu Gly Asp Arg Val Lys Lys Leu  
100 105 110

Ile Asn Ser Gln Ile Ser Leu Leu Ile Gly Lys Gly Leu His Glu Phe  
115 120 125

25 Asp Ser Leu Cys Asp Pro Glu Val Asn Asp Phe Arg Ala Lys Met Cys  
130 135 140

Gln Phe Cys Glu Glu Ala Ala Ala Arg Arg Gln Gln Leu Gly Trp Glu  
145 150 155 160

30 Ala Trp Leu Gln Tyr Ser Phe Pro Leu Gln Leu Glu Pro Ser Ala Gln  
165 170 175

35 Thr Trp Gly Pro Gly Thr Leu Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Leu Val  
180 185 190

Asn Val Lys Phe Glu Gly Ser Glu Glu Ser Phe Thr Phe Gln Val Ser  
195 200 205

40 Thr Lys Asp Val Pro Leu Ala Leu Met Ala Cys Ala Leu Arg Lys Lys  
210 215 220

45 Ala Thr Val Phe Arg Gln Pro Leu Val Glu Gln Pro Glu Asp Tyr Thr  
225 230 235 240

Leu Gln Val Asn Gly Arg His Glu Tyr Leu Tyr Gly Asn Tyr Pro Leu  
245 250 255

50 Cys Gln Phe Gln Tyr Ile Cys Ser Cys Leu His Ser Gly Leu Thr Pro  
260 265 270

His Leu Thr Met Val His Ser Ser Ser Ile Leu Ala Met Arg Asp Glu  
275 280 285

55 Gln Ser Asn Pro Ala Pro Gln Val Gln Lys Pro Arg Ala Lys Pro Pro  
290 295 300

Pro Ile Pro Ala Lys Lys Pro Ser Ser Val Ser Leu Trp Ser Leu Glu  
305 310 315 320

60 Gln Pro Phe Arg Ile Glu Leu Ile Gln Gly Ser Lys Val Asn Ala Asp  
325 330 335

65 Glu Arg Met Lys Leu Val Val Gln Ala Gly Leu Phe His Gly Asn Glu  
340 345 350

ES 2 605 792 T3

5 Met Leu Cys Lys Thr Val Ser Ser Ser Glu Val Ser Val Cys Ser Glu  
355 360 365

Pro Val Trp Lys Gln Arg Leu Glu Phe Asp Ile Asn Ile Cys Asp Leu  
370 375 380

10 Pro Arg Met Ala Arg Leu Cys Phe Ala Leu Tyr Ala Val Ile Glu Lys  
385 390 395 400

Ala Lys Lys Ala Arg Ser Thr Lys Lys Lys Ser Lys Lys Ala Asp Cys  
405 410 415

15 Pro Ile Ala Trp Ala Asn Leu Met Leu Phe Asp Tyr Lys Asp Gln Leu  
420 425 430

20 Lys Thr Gly Glu Arg Cys Leu Tyr Met Trp Pro Ser Val Pro Asp Glu  
435 440 445

Lys Gly Glu Leu Leu Asn Pro Thr Gly Thr Val Arg Ser Asn Pro Asn  
450 455 460

25 Thr Asp Ser Ala Ala Ala Leu Leu Ile Cys Leu Pro Glu Val Ala Pro  
465 470 475 480

His Pro Val Tyr Tyr Pro Ala Leu Glu Lys Ile Leu Glu Leu Gly Arg  
485 490 495

30 His Ser Glu Cys Val His Val Thr Glu Glu Glu Gln Leu Gln Leu Arg  
500 505 510

35 Glu Ile Leu Glu Arg Arg Gly Ser Gly Glu Leu Tyr Glu His Glu Lys  
515 520 525

Asp Leu Val Trp Lys Leu Arg His Glu Val Gln Glu His Phe Pro Glu  
530 535 540

40 Ala Leu Ala Arg Leu Leu Leu Val Thr Lys Trp Asn Lys His Glu Asp  
545 550 555 560

45 Val Ala Gln Met Leu Tyr Leu Leu Cys Ser Trp Pro Glu Leu Pro Val  
565 570 575

Leu Ser Ala Leu Glu Leu Leu Asp Phe Ser Phe Pro Asp Cys His Val  
580 585 590

50 Gly Ser Phe Ala Ile Lys Ser Leu Arg Lys Leu Thr Asp Asp Glu Leu  
595 600 605

Phe Gln Tyr Leu Leu Gln Leu Val Gln Val Leu Lys Tyr Glu Ser Tyr  
610 615 620

55 Leu Asp Cys Glu Leu Thr Lys Phe Leu Leu Asp Arg Ala Leu Ala Asn  
625 630 635 640

60 Arg Lys Ile Gly His Phe Leu Phe Trp His Leu Arg Ser Glu Met His  
645 650 655

Val Pro Ser Val Ala Leu Arg Phe Gly Leu Ile Leu Glu Ala Tyr Cys  
660 665 670

65 Arg Gly Ser Thr His His Met Lys Val Leu Met Lys Gln Gly Glu Ala  
675 680 685

ES 2 605 792 T3

5 Leu Ser Lys Leu Lys Ala Leu Asn Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gln  
690 695 700

Lys Thr Pro Lys Pro Gln Thr Lys Glu Leu Met His Leu Cys Met Arg  
705 710 715 720

10 Gln Glu Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Gln Ser Pro Leu Asp  
725 730 735

15 Pro Ser Thr Leu Leu Ala Glu Val Cys Val Glu Gln Cys Thr Phe Met  
740 745 750

Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser Asn Glu Glu Ala  
755 760 765

20 Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu  
770 775 780

Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu Met Asp Val Leu  
785 790 795 800

25 Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro Tyr Gly Cys Leu  
805 810 815

30 Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val Leu Arg Ser Asp  
820 825 830

Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met Ala Ala Thr Ala  
835 840 845

35 Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Lys Asn Pro  
850 855 860

Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser Cys Ala  
865 870 875 880

40 Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Ser  
885 890 895

45 Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe  
900 905 910

Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly Ile Asn Arg Glu  
915 920 925

50 Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val His Val Ile Gln Gln  
930 935 940

55 Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu Arg Phe Arg Gly Tyr Cys  
945 950 955 960

Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg His Gly Leu Leu Phe Leu His  
965 970 975

60 Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala Gly Leu Pro Glu Leu Ser Cys Ser  
980 985 990

Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala Leu Gly Lys Thr Glu  
995 1000 1005

65 Glu Glu Ala Leu Lys His Phe Arg Val Lys Phe Asn Glu Ala Leu  
1010 1015 1020

ES 2 605 792 T3

Leu Ser Lys Leu Lys Ala Leu Asn Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gln  
 690 695 700  
 Lys Thr Pro Lys Pro Gln Thr Lys Glu Leu Met His Leu Cys Met Arg  
 705 710 715 720  
 5 Gln Glu Ala Tyr Leu Glu Ala Leu Ser His Leu Gln Ser Pro Leu Asp  
 725 730 735  
 Pro Ser Thr Leu Leu Ala Glu Val Cys Val Glu Gln Cys Thr Phe Met  
 10 740 745 750  
 Asp Ser Lys Met Lys Pro Leu Trp Ile Met Tyr Ser Asn Glu Glu Ala  
 755 760 765  
 15 Gly Ser Gly Gly Ser Val Gly Ile Ile Phe Lys Asn Gly Asp Asp Leu  
 770 775 780  
 Arg Gln Asp Met Leu Thr Leu Gln Met Ile Gln Leu Met Asp Val Leu  
 20 785 790 795 800  
 Trp Lys Gln Glu Gly Leu Asp Leu Arg Met Thr Pro Tyr Gly Cys Leu  
 805 810 815  
 Pro Thr Gly Asp Arg Thr Gly Leu Ile Glu Val Val Leu Arg Ser Asp  
 25 820 825 830  
 Thr Ile Ala Asn Ile Gln Leu Asn Lys Ser Asn Met Ala Ala Thr Ala  
 835 840 845  
 30 Ala Phe Asn Lys Asp Ala Leu Leu Asn Trp Leu Lys Ser Lys Asn Pro  
 850 855 860  
 Gly Glu Ala Leu Asp Arg Ala Ile Glu Glu Phe Thr Leu Ser Cys Ala  
 35 865 870 875 880  
 Gly Tyr Cys Val Ala Thr Tyr Val Leu Gly Ile Gly Asp Arg His Ser  
 885 890 895  
 40 Asp Asn Ile Met Ile Arg Glu Ser Gly Gln Leu Phe His Ile Asp Phe  
 900 905 910  
 Gly His Phe Leu Gly Asn Phe Lys Thr Lys Phe Gly Ile Asn Arg Glu  
 45 915 920 925  
 Arg Val Pro Phe Ile Leu Thr Tyr Asp Phe Val His Val Ile Gln Gln  
 930 935 940  
 Gly Lys Thr Asn Asn Ser Glu Lys Phe Glu Arg Phe Arg Gly Tyr Cys  
 50 945 950 955 960  
 Glu Arg Ala Tyr Thr Ile Leu Arg Arg His Gly Leu Leu Phe Leu His  
 965 970 975  
 55 Leu Phe Ala Leu Met Arg Ala Ala Gly Leu Pro Glu Leu Ser Cys Ser  
 980 985 990  
 Lys Asp Ile Gln Tyr Leu Lys Asp Ser Leu Ala Leu Gly Lys Thr Glu  
 60 995 1000 1005  
 Glu Glu Ala Leu Lys His Phe Arg Val Lys Phe Asn Glu Ala Leu  
 1010 1015 1020

65

ES 2 605 792 T3

5 Arg Glu Ser Trp Lys Thr Lys Val Asn Trp Leu Ala His Asn Val  
1025 1030 1035

10 Ser Lys Asp Asn Arg Gln  
1040

15 <212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador 5' para p110beta

20 <400> 3

gatcgaattc ggcgccacca tggactacaa ggacgacgat gacaagtgct tcagtttcat 60  
25 aatgcctcc 69

30 <210> 4  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador 3' para p110beta

35 <400> 4  
gatcgcggcc gcttaagatc ttagtcttt ccgaactgtg tg 42

40 <210> 5  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Cebador 5' para p110gamma

<400> 5  
agaatgcggc cgcatggagc tggagaacta taaacagccc 40

50 <210> 6  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Cebador 3' para p110gamma

60 <400> 6  
cgcgatcct taggctgaat gtttctctcc ttgtttg 37

65

5 **Reivindicaciones**

1. Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto:

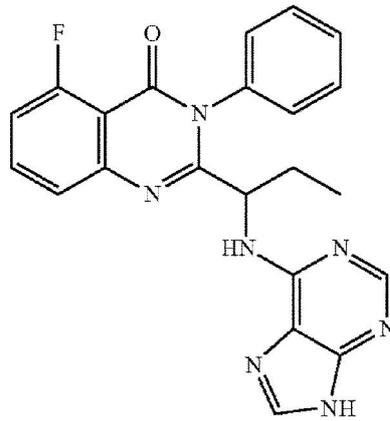
10

15

20

25

30



35

donde la sal farmacéuticamente aceptable se selecciona a partir del grupo consistente en hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro y sal de fosfato.

40

2. La sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la declaración 1 donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal hidrocioruro.

3. La sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la declaración 1 donde el compuesto es el S-enatiómero.

4. La sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la declaración 1 donde el compuesto es

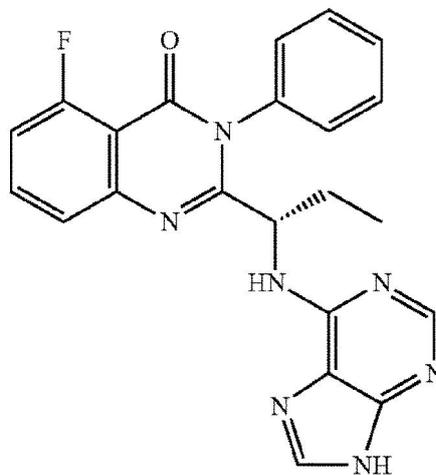
45

50

55

60

65



y la sal farmacéuticamente aceptable es la sal de hidrocioruro.

**5.** Una composición farmacéutica comprendiendo una sal farmacéuticamente aceptable de la declaración 1 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 **6.** La composición farmacéutica de acuerdo con la declaración 5 donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal hidrocioruro.

10 **7.** La composición farmacéutica de la declaración 5 donde el compuesto es el S-enantiómero.

**8.** La composición farmacéutica de acuerdo con la declaración 7 donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal hidrocioruro.

**9.** Un kit que comprende la sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con la declaración 1.

15 **10.** El kit de acuerdo con la declaración 9 donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal hidrocioruro.

**11.** El kit de acuerdo con la declaración 9 donde el compuesto es el S-enantiómero.

20 **12.** El kit de acuerdo con la declaración 11 donde la sal farmacéuticamente aceptable es la sal hidrocioruro.

25

30

35

40

45

50

55

60

65