

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 383**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.04.2001** **E 15200992 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020** **EP 3029041**

54 Título: **Inhibidores de delta fosfatidilo-inositol 3-quinasa humana**

30 Prioridad:

25.04.2000 US 199655 P
05.10.2000 US 238057 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.10.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 788 383 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de delta fosfatidilo-inositol 3-quinasa humana

5 **REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos con número de serie 60/199,655, presentada el 25 de abril de 2000 y la solicitud provisional de los Estados Unidos con el número de serie 60/238,057, presentada el 25 de octubre de 2000.

10

CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere en general a enzimas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), y más particularmente a inhibidores selectivos de la actividad de PI3K y a métodos para usar tales materiales.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] La señalización celular a través de fosfoinositidas fosforiladas en 3' se ha implicado en una variedad de procesos celulares, por ejemplo, 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 de generar estos productos de señalización fosforilada, la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI 3-quinasa; PI3K), se identificó originalmente como una actividad asociada con oncoproteínas virales y quinasas tirosina receptoras del factor de crecimiento que fosforila el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el 3'-hidroxilo del anillo de inositol (Panayotou et al., Trends Cell Biol 2: 358-60 (1992)).

20

25

[0004] Los niveles de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), el producto principal de la activación de PI 3-quinasa, aumentan con el tratamiento de las células con una variedad de agonistas. Por lo tanto, se cree que la activación de PI 3-quinasa está involucrada en un rango de respuestas celulares que incluyen crecimiento celular, diferenciación y apoptosis (Parker et al., Current Biology, 5: 577-99 (1995); Yao et al., Science, 267: 2003-05 (1995)). Aunque los objetivos posteriores de los lípidos fosforilados generados después de la activación de la PI 3-quinasa no se han caracterizado bien, la evidencia emergente sugiere que las proteínas que contienen el dominio de la homología de pleckstrina y el dominio del dedo FYVE se activan cuando se unen a varios lípidos de fosfatidilinositol (Sternmark et al., J Cell Sci, 112: 4175-83 (1999); Lemmon et al., Trends Cell Biol, 7: 237-42 (1997)). In vitro, algunas isoformas de la proteína quinasa C (PKC) son activadas directamente por PIP3, y la proteína quinasa relacionada con PKC, PKB, ha sido activada por PI 3-quinasa (Burgering et al., Nature, 376: 599-602 (1995)).

30

35

[0005] Actualmente, la familia de enzimas PI 3-quinasas se ha dividido en tres clases en función de sus especificidades de sustrato. Los PI3K de clase I pueden fosforilar fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-fosfato y fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato de fosfato y fosfatidilinositol-3,4-bifosidina, 4,5-trifosfato, respectivamente. Los PI3K de clase II fosforilan PI y fosfatidilinositol-4-fosfato, mientras que los PI3K de clase III solo pueden fosforilar PI.

40

45

[0006] La purificación inicial y la clonación molecular de PI 3-quinasa revelaron que era un heterodímero que constaba de las subunidades p85 y p110 (Otsu y col., Cell, 65: 91-104 (1991); Hiles y col., Cell, 70: 419-29 (1992)). Desde entonces, se han identificado cuatro PI3K de Clase I distintas, denominadas PI3K α , β , δ y γ , cada una de las cuales consta de una subunidad catalítica distinta de 110 kDa y una subunidad reguladora. Más específicamente, tres de las subunidades catalíticas, es decir, p110 α , p110 β y p110 δ , cada una interactúa con la misma subunidad reguladora, p85; mientras que p110 γ interactúa con una subunidad reguladora distinta, p101. Como se describe a continuación, los patrones de expresión de cada una de estas PI3K en células y tejidos humanos también son distintos. Aunque en el pasado reciente se ha acumulado una gran cantidad de información sobre las funciones celulares de las PI 3-quinasas en general, los roles desempeñados por las isoformas individuales son en gran medida desconocidos.

50

[0007] Se ha descrito la clonación de p110 α bovino. Esta proteína se identificó como relacionada con la proteína *Saccharomyces cerevisiae*: Vps34p, una proteína involucrada en el procesamiento de la proteína vacuolar. También se demostró que el producto recombinante p110 α se asocia con p85 α , para producir una actividad PI3K en células COS-1 transfectadas. Ver Hiles et al., Cell, 70, 419-29 (1992).

55

[0008] La clonación de una segunda isoforma p110 humana, designada p110 β , se describe en Hu et al., Mol Cell Biol, 13: 7677-88 (1993). Se dice que esta isoforma se asocia con p85 en las células y se expresa de manera ubicua, ya que se ha encontrado ARNm de p110 β en numerosos tejidos humanos y de ratón, así como en células endoteliales de vena umbilical humana, células T leucémicas humanas Jurkat, 293 células de riñón embrionario humano, fibroblastos de ratón 3T3, células HeLa y células de carcinoma de vejiga de rata NBT2. Tal expresión amplia sugiere que esta isoforma es ampliamente importante en las vías de señalización.

60

[0009] La identificación de la isoforma p110 δ de PI 3-quinasa se describe en Chantry et al., J Biol Chem, 272: 19236-41 (1997). Se observó que la isoforma p110 δ humana se expresa de forma restringida a los tejidos. Se expresa a

65

niveles altos en linfocitos y tejidos linfoides, lo que sugiere que la proteína podría desempeñar un papel en la señalización mediada por PI 3-quinasa en el sistema inmune. Los detalles relativos a la isoforma P110 δ también se pueden encontrar en las patentes de los Estados Unidos números 5,858,753; 5,822,910; y 5,985,589. Véanse también Vanhaesebroeck et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 94: 4330-5 (1997), y la publicación internacional WO 97/46688.

[0010] En cada uno de los subtipos PI3K α , β y δ , la subunidad p85 actúa para localizar PI 3-quinasa en la membrana plasmática mediante la interacción de su dominio SH2 con residuos de tirosina fosforilados (presentes en un contexto de secuencia apropiado) en proteínas diana (Rameh et al., Cell, 83: 821-30 (1995)). Se han identificado dos isoformas de p85, p85 α , que se expresa de manera ubicua, y p85 β , que se encuentra principalmente en el cerebro y los tejidos linfoides (Volinia et al., Oncogene, 7: 789-93 (1992)). La asociación de la subunidad p85 a las subunidades catalíticas PI 3-quinasa p110 α , β o δ parece ser necesaria para la actividad catalítica y la estabilidad de estas enzimas. Además, la unión de las proteínas Ras también aumenta la actividad de PI 3-quinasa.

[0011] La clonación de p110 γ reveló aún más complejidad dentro de la familia de enzimas PI3K (Stoyanov et al., Science, 269: 690-93 (1995)). La isoforma p110 γ está estrechamente relacionada con p110 α y p110 β (identidad del 45-48% en el dominio catalítico), pero como se indicó, no utiliza p85 como una subunidad de direccionamiento. En cambio, p110 γ contiene un dominio adicional denominado "dominio de homología de pleckstrina" cerca de su extremo amino. Este dominio permite la interacción de p110 γ con las subunidades $\beta\gamma$ de las proteínas heterotriméricas G y esta interacción parece regular su actividad.

[0012] La subunidad reguladora p101 para PI3K γ se clonó originalmente en cerdos, 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 γ parece ser crítica para la activación de PI3K γ a través de G $\beta\gamma$ mencionado anteriormente.

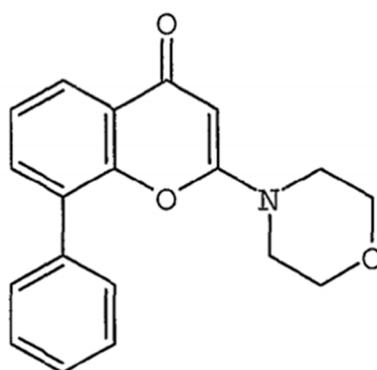
[0013] Un polipéptido PI3K constitutivamente activo se describe en la publicación internacional WO 96/25488. Esta publicación describe la preparación de una proteína de fusión quimérica en donde un fragmento de 102 residuos de p85 conocido como la región inter-SH2 (iSH2) se fusiona a través de una región enlazadora al extremo N-terminal de p110 murino. El dominio p85 iSH2 aparentemente puede activar la actividad PI3K de una manera comparable a la p85 intacta (Klippel et al., Mol Cell Biol, 14: 2675-85 (1994)).

[0014] Por lo tanto, las PI 3-quinasas pueden definirse por su identidad de aminoácidos o por su actividad. Los miembros adicionales de esta creciente familia de genes incluyen lípidos y proteínas quinasas más distantes, incluyendo Vps34 TOR1 y TOR2 de *Saccharomyces cerevisiae* (y sus homólogos de mamíferos como FRAP y mTOR), el producto del gen de ataxia telangiectasia (ATR) y la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (ADN-PK). Ver generalmente, Hunter, Cell, 83: 1-4 (1995).

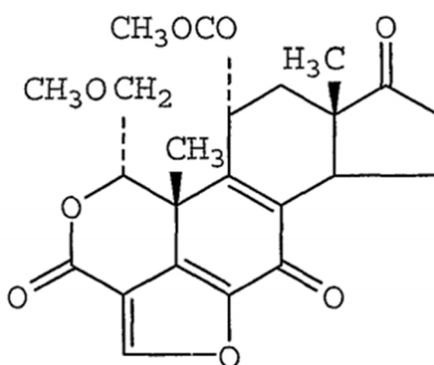
[0015] PI 3-quinasa también parece estar involucrada en una serie de aspectos de la activación de leucocitos. Se ha demostrado que una actividad de PI 3-quinasa asociada a p85 se asocia físicamente con el dominio citoplasmático de CD28, que es una molécula coestimuladora importante para la activación de células T en respuesta al antígeno (Pages et al., Nature, 369: 327-29 (1994); Rudd, Immunity, 4: 527-34 (1996)). La activación de las células T a través de CD28 reduce el umbral de activación por antígeno y aumenta la magnitud y la duración de la respuesta proliferativa. Estos efectos están relacionados con aumentos en la transcripción de varios genes, incluida la interleucina-2 (IL2), un importante factor de crecimiento de células T (Fraser et al., Science, 251: 313-16 (1991)). La mutación de CD28 de modo que ya no puede interactuar con PI 3-quinasa conduce a un fallo en el inicio de la producción de IL2, lo que sugiere un papel crítico para PI 3-quinasa en la activación de células T.

[0016] Los inhibidores específicos contra miembros individuales de una familia de enzimas proporcionan herramientas invaluable para descifrar las funciones de cada enzima. Dos compuestos, LY294002 y wortmanina, han sido ampliamente utilizados como inhibidores de la PI 3-quinasa. Sin embargo, estos compuestos son inhibidores inespecíficos de PI3K, ya que no distinguen entre los cuatro miembros de las PI 3-quinasas de Clase I. Por ejemplo, los valores CI_{50} de wortmanina frente a cada una de las diversas PI 3-quinasas de Clase I están en el rango de 1-10 nM. de manera similar, los valores de CI_{50} para LY294002 frente a cada una de estas PI 3-quinasas es de aproximadamente 1 μ M (Fruman y col., Ann Rev Biochem, 67: 481-507 (1998)). Por lo tanto, la utilidad de estos compuestos en el estudio de las funciones de las PI 3-quinasas individuales de Clase I es limitado.

[0017] Según los estudios que utilizan wortmanina, existe evidencia de que la función PI 3-quinasa también es necesaria para algunos aspectos de la señalización de leucocitos a través de receptores acoplados a proteínas G (Thelen et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU., 91: 4960-64 (1994)) Además, se ha demostrado que wortmanina y LY294002 bloquean la migración de neutrófilos y la liberación de superóxido. Sin embargo, en la medida en que estos compuestos no distinguen entre las diversas isoformas de PI3K, no está claro qué isoforma o isoformas de PI3K en particular están involucradas en estos fenómenos.



LY294002



wortmanina

[0018] En vista de las consideraciones anteriores, está claro que falta conocimiento existente con respecto a las características estructurales y funcionales de las enzimas PI 3-quinasas, que incluyen localización subcelular, estados de activación y afinidades de sustrato.

[0019] Además, las funciones que realizan estas enzimas en los tejidos normales y enfermos aún no se han dilucidado. En particular, la función de PI3K δ en leucocitos no se ha caracterizado previamente, y el conocimiento sobre su función en fisiología humana sigue siendo limitado. La coexpresión en estos tejidos de otras isoformas de PI3K ha confundido hasta ahora los esfuerzos para segregar las actividades de cada enzima. Además, la separación de las actividades de las diversas isoenzimas de PI3K puede no ser posible sin la identificación de inhibidores que demuestren características de inhibición selectiva. De hecho, los solicitantes no son actualmente conscientes de que tales inhibidores selectivos, o mejor, específicos, de isoformas PI3K han sido demostrados.

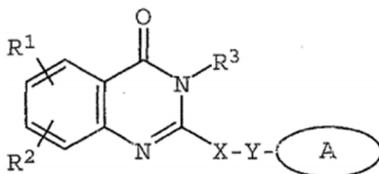
[0020] Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de una caracterización estructural adicional del polipéptido PI3K δ . También existe una necesidad de caracterización funcional de PI3K δ . Además, nuestra comprensión de PI3K δ requiere una mayor elaboración de las interacciones estructurales de p110 δ , tanto con su subunidad reguladora como con otras proteínas en la célula. También existe la necesidad de inhibidores selectivos o específicos de las isoenzimas PI3K, para que las funciones de cada isoenzima puedan caracterizarse mejor. En particular, los inhibidores selectivos o específicos de PI3K δ son deseables para explorar el papel de esta isoenzima y para el desarrollo de productos farmacéuticos para modular la actividad de la isoenzima.

[0021] WO 98/33802 describe compuestos de quinazolinona que tienen la capacidad de inhibir la actividad de la enzima poli(ADP-ribosa)polimerasa.

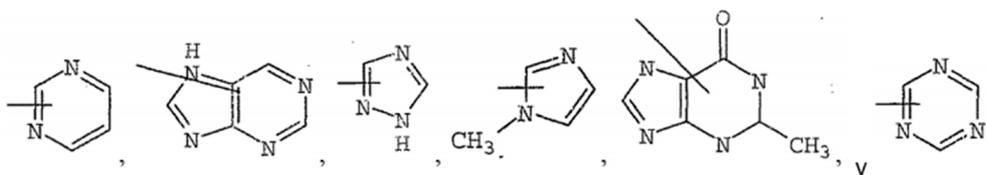
[0022] Un aspecto de la presente invención es proporcionar compuestos que puedan inhibir la actividad biológica de PI3K δ humano. Otro aspecto de la invención es proporcionar compuestos que inhiban selectivamente PI3K δ mientras que tienen una potencia inhibitoria relativamente baja contra las otras isoformas de PI3K. Otro aspecto de la invención es proporcionar métodos para caracterizar la función de PI3K δ humano. Otro aspecto de la invención es proporcionar métodos para modular selectivamente la actividad de PI3K δ humana, y de ese modo promover el tratamiento médico de enfermedades mediadas por la disfunción de PI3K δ . Otros aspectos y ventajas de la invención serán fácilmente evidentes para el artesano que tenga una experiencia ordinaria en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

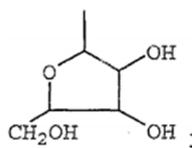
[0023] Se ha descubierto ahora que la presente invención puede lograr estos y otros aspectos, que, en un aspecto, es un compuesto que tiene la fórmula estructural general



en donde el sistema de anillo A se selecciona del grupo que consiste en



en donde el sistema de anillo A está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de $N(R^a)_2$, halo, C_{1-3} alquilo, $S(C_{1-3}$ alquilo), OR^a y

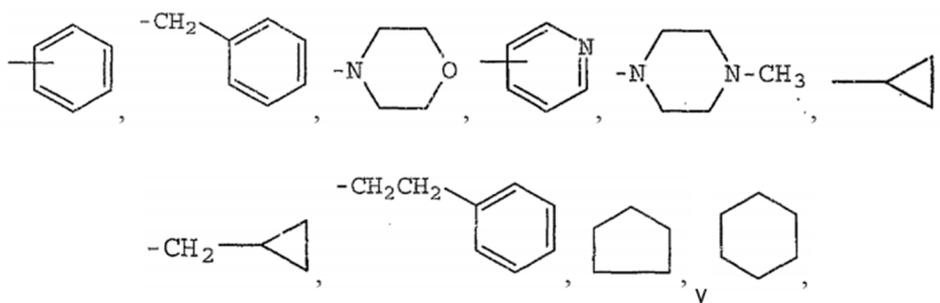


X se selecciona del grupo que consiste en CHR^b , CH_2CHR^b y $CH=C(R^b)$;

Y se selecciona del grupo que consiste en nulo y NH;

R^1 y R^2 , independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, OR^a , halo, C_{1-6} alquilo, CF_3 , NO_2 , $N(R^a)_2$, NR^aC_{1-3} alquilenon $(R^a)_2$ y OC_{1-3} alquilenon OR^a ;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en

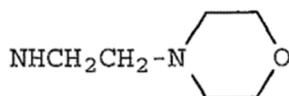


en donde el grupo R^3 está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de halo, OR^a , C_{1-6} alquilo, arilo, heteroarilo, NO_2 , $N(R^a)_2$, $NR^aSO_2CF_3$, $NR^aC(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, $N(R^a)C_{1-4}$ alquilenon $(R^a)_2$, $SO_2N(R^a)_2$, CN, $C(=O)R^a$, alquilenon $C_{1-4}N(R^a)_2$ y alquilenon $OC_{1-4}N(R^a)_2$;

R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-6} alquilo, C_{3-8} cicloalquilo, C_{3-8} heterocicloalquilo, C_{1-3} alquilenon $(R^a)_2$, arilo, arilo C_{1-3} alquilo, C_{1-3} alquilenonarilo, heteroarilo, heteroarilo C_{1-3} alquilo, y C_{1-3} alquilenonheteroarilo; o dos grupos R^a se toman juntos para formar un anillo de 5 o 6 miembros, que opcionalmente contiene al menos un heteroátomo;

R^b se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-6} alquilo, arilo, heteroarilo, arilo, C_{1-3} alquilo, heteroarilo, C_{1-3} alquilo, C_{1-3} alquilenilo y C_{1-3} heteroariloalquilenilo; y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0024] En una realización del primer aspecto, X se selecciona del grupo que consiste en CH_2 , CH_2CH_2 , $CH=CH$, $CH(CH_3)$, $CH_2CH(CH_3)$ y $C(CH_3)_2$. En una realización del primer aspecto, Y es NH. En una realización del primer aspecto, R^1 y R^2 se seleccionan independientemente de H, OCH_3 , Cl, Br, F, CH_3 , CF_3 , NO_2 , OH, $N(CH_3)_2$,



5 y O(CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

10 **[0025]** En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto del primer aspecto, en donde la composición está formulada para administración oral. En una realización del segundo aspecto, la composición farmacéutica está en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, grageas, grageas, líquidos, geles, jarabes; lodos, elixires, suspensiones o polvos, como tabletas, grageas y cápsulas de gelatina. En una forma de realización del segundo aspecto, cuando la composición está en forma de tabletas, grageas o cápsulas de gelatina, la composición puede contener uno o más excipientes seleccionados del grupo que comprende: a) diluyentes, como azúcares, incluida la lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol; b) aglutinantes, tales como silicato de aluminio y magnesio, almidón de maíz, trigo, arroz, o papa; c) materiales de celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, gomas, como goma arábiga y goma de tragacanto, y proteínas, como gelatina y colágeno; d) agentes desintegrantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, almidones, agar, ácido algínico o una sal de los mismos, tales como alginato de sodio o composiciones efervescentes; e) lubricantes, como sílice, talco, ácido esteárico o sus sal de magnesio o calcio, y polietilenglicol; f) aromatizantes y edulcorantes; g) colorantes o pigmentos; y h) otros ingredientes, tales como conservantes, estabilizadores, agentes de hinchamiento, agentes emulsionantes, promotores de soluciones, sales para regular la presión osmótica y tampones. En una realización del segundo aspecto, el compuesto está presente en una cantidad de 0,01 mg a 10.000 mg; o de 0,1 mg a 1.000 mg.

25 **[0026]** En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto del primer aspecto o una composición farmacéutica del segundo aspecto para uso en terapia.

30 **[0027]** Estas y otras características y ventajas de la presente invención se apreciarán a partir de la descripción detallada y los ejemplos que se exponen aquí. La descripción detallada y los ejemplos se proporcionan para mejorar la comprensión de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028]

35 La Figura 1 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ de la invención sobre la actividad de tres isoformas de PI3K.
 La Figura 2 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la generación de superóxido por neutrófilos humanos en presencia de TNF o IgG.
 40 La Figura 3 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la generación de superóxido por neutrófilos humanos en presencia de TNF o fMLP.
 La Figura 4 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la exocitosis de elastasa en presencia de fMLP por neutrófilos humanos.
 45 La Figura 5 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la quimiotaxis inducida por fMLP por neutrófilos humanos.
 La Figura 6 muestra que un inhibidor selectivo de PI3Kδ no afecta la fagocitosis y la muerte de *S. aureus* por los neutrófilos.
 La Figura 7 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la proliferación y la producción de anticuerpos por los linfocitos B humanos.
 50 La Figura 8 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la proliferación de linfocitos B esplénicos de ratón estimulados con anti-IgM.
 La Figura 9 muestra el efecto de un inhibidor selectivo de PI3Kδ sobre la exocitosis de elastasa en un modelo animal.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

60 **[0029]** La invención proporciona compuestos que inhiben selectivamente la actividad de PI3Kδ. La invención proporciona además métodos para inhibir la actividad de PI3Kδ, incluidos métodos para modular selectivamente la actividad de la isoenzima de PI3Kδ en células, especialmente leucocitos, osteoclastos y células cancerosas. Los métodos incluyen aplicaciones *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

65 **[0030]** De particular beneficio son los métodos de modulación selectiva de la actividad de PI3Kδ en el entorno clínico para mejorar enfermedades o trastornos mediados por la actividad de PI3Kδ. Por lo tanto, el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una actividad de PI3Kδ excesiva o inapropiada puede tratarse mediante el uso de moduladores selectivos de PI3Kδ de acuerdo con la invención.

5 [0031] Otros métodos de la descripción incluyen permitir la caracterización adicional del papel fisiológico de la isoenzima. Además, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden inhibidores selectivos de PI3Kδ. También se proporcionan artículos de fabricación que comprenden un compuesto inhibidor selectivo de PI3Kδ (o una composición farmacéutica que comprende el compuesto) e instrucciones para usar el compuesto. Ahora se describen detalles de estas y otras realizaciones útiles de la invención.

10 [0032] Los métodos descritos en el presente documento se benefician del uso de compuestos que inhiben selectivamente, y preferiblemente inhiben específicamente, la actividad de PI3Kδ en las células, incluidas las células *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Las células útiles en los métodos incluyen aquellas que expresan PI3Kδ endógeno, en donde endógeno indica que las células expresan PI3Kδ ausente de la introducción recombinante en las células de uno o más polinucleótidos que codifican un polipéptido PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo del mismo. Los métodos también abarcan el uso de células que expresan PI3Kδ exógeno, en donde uno o más polinucleótidos que codifican PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo del mismo se han introducido en la célula usando procedimientos recombinantes.

15 [0033] De particular ventaja, las células pueden estar *in vivo*, es decir, en un sujeto vivo, por ejemplo, un animal o un ser humano, en donde un inhibidor de PI3Kδ puede usarse como un agente terapéutico para inhibir la actividad de PI3Kδ en el sujeto. Alternativamente, las células pueden aislarse como células discretas o en un tejido, para métodos *ex vivo* o *in vitro*. Los métodos *in vitro* también abarcados por la invención pueden comprender el paso de poner en contacto una enzima PI3Kδ o un fragmento biológicamente activo de la misma con un compuesto inhibidor de la invención. La enzima PI3Kδ puede incluir una enzima purificada y aislada, en donde la enzima se aísla de una fuente natural (p. ej., células o tejidos que normalmente expresan un polipéptido PI3Kδ sin modificación por tecnología recombinante) o se aísla de células modificadas por técnicas recombinantes para expresar enzima exógena.

20 [0034] El término "inhibidor selectivo de PI3Kδ", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que inhibe la isoenzima PI3Kδ de manera más eficaz que otras isoenzimas de la familia PI3K. Se entiende que un compuesto "inhibidor selectivo de PI3Kδ" es más selectivo para PI3Kδ que los compuestos designados convencional y genéricamente como inhibidores de PI3K, por ejemplo, wortmanina o LY294002. Concomitantemente, wortmanina y LY294002 se consideran "inhibidores no selectivos de PI3K". Los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3Kδ pueden usarse como inhibidores selectivos de PI3Kδ en los métodos descritos aquí.

25 [0035] Además, los compuestos de cualquier tipo que regulan selectivamente negativamente la expresión o actividad de PI3Kδ y que poseen propiedades farmacológicas aceptables pueden usarse como inhibidores selectivos de PI3Kδ en los métodos terapéuticos descritos aquí.

30 [0036] Las eficacias relativas de los compuestos como inhibidores de una actividad enzimática (u otra actividad biológica) pueden establecerse determinando las concentraciones a las que cada compuesto inhibe la actividad en un grado predefinido y luego comparando los resultados. Típicamente, la determinación preferida es la concentración que inhibe el 50% de la actividad en un ensayo bioquímico, es decir, la concentración inhibitoria del 50% o "CI₅₀". Las determinaciones de CI₅₀ se pueden lograr usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En general, se puede determinar una CI₅₀ midiendo la actividad de una enzima dada en presencia de un rango de concentraciones del inhibidor en estudio. Los valores de actividad enzimática obtenidos experimentalmente se grafican contra las concentraciones de inhibidor utilizadas. La concentración del inhibidor que muestra un 50% de actividad enzimática (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor CI₅₀. Análogamente, se pueden definir otras concentraciones inhibitorias a través de determinaciones apropiadas de actividad. Por ejemplo, en algunos entornos puede ser deseable establecer una concentración inhibitoria del 90%, es decir, CI₉₀.

35 [0037] Por consiguiente, se puede entender que un "inhibidor selectivo de PI3Kδ" se refiere a un compuesto que exhibe una concentración inhibitoria del 50% (CI₅₀) con respecto a PI3Kδ que es al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, y más preferiblemente al menos 30 veces, menor que el valor CI₅₀ con respecto a cualquiera o todos los otros miembros de la familia Clase I PI3K. El término "inhibidor específico de PI3Kδ" puede entenderse que se refiere a un compuesto inhibidor selectivo de PI3Kδ que exhibe una CI₅₀ con respecto a PI3Kδ que es al menos 50 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 200 veces, y aún más preferiblemente al menos 500 veces, más bajo que el CI₅₀ con respecto a cualquiera o todos los otros miembros de la familia PI3K Clase I.

40 [0038] Entre otras cosas, la invención proporciona métodos para inhibir la función leucocitaria. Más particularmente, la invención proporciona métodos para inhibir o suprimir funciones de neutrófilos y linfocitos T y B. Con respecto a los neutrófilos tc, se ha encontrado inesperadamente que la inhibición de la actividad de PI3Kδ inhibe las funciones de los neutrófilos. Por ejemplo, se ha observado que los compuestos de la invención provocan la inhibición de las funciones clásicas de neutrófilos tales como la liberación estimulada de superóxido, la exocitosis estimulada y la migración quimiotáctica. Sin embargo, se ha observado además que el método de la invención permite la supresión de ciertas funciones de neutrófilos, sin afectar sustancialmente otras funciones de estas células. Por ejemplo, se ha observado

que los compuestos inhibidores selectivos de PI3K δ de la invención no inhiben sustancialmente la fagocitosis de las bacterias por parte de los neutrófilos.

[0039] Por lo tanto, la descripción incluye métodos para inhibir las funciones de neutrófilos, sin inhibir sustancialmente la fagocitosis de bacterias. Las funciones de neutrófilos adecuadas para la inhibición según el método incluyen cualquier función que esté mediada por la actividad o expresión de PI3K δ . Dichas funciones incluyen, sin limitación, liberación estimulada de superóxido, exocitosis o desgranulación estimulada, migración quimiotáctica, adhesión al endotelio vascular (p. ej., anclaje/rodadura de neutrófilos, activación de la actividad de neutrófilos y/o retención de neutrófilos en el endotelio), diapedesis transmural o emigración a través del endotelio a tejidos periféricos. En general, estas funciones pueden denominarse colectivamente "funciones inflamatorias", ya que normalmente están relacionadas con la respuesta de neutrófilos a la inflamación. Las funciones inflamatorias de los neutrófilos se pueden distinguir de las funciones de destrucción bacteriana exhibidas por estas células, por ejemplo, fagocitosis y eliminación de bacterias. Por consiguiente, la invención incluye además métodos para tratar estados de enfermedad en los que una o más de las funciones inflamatorias de los neutrófilos son anormales o indeseables.

[0040] Además, se ha establecido mediante la invención que PI3K δ desempeña un papel en la proliferación estimulada de linfocitos, incluidas las células B y las células T. Además, PI3K δ parece desempeñar un papel en la secreción estimulada de anticuerpos por las células B. Los compuestos inhibidores selectivos de PI3K δ de la invención se han empleado para establecer que estos fenómenos se pueden derogar mediante la inhibición de PI3K δ . Por lo tanto, la descripción incluye métodos para inhibir la proliferación de linfocitos y métodos para inhibir la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Otros métodos habilitados por la invención incluyen métodos para tratar estados de enfermedad en los que una o más de estas funciones linfocitarias son anormales o indeseables.

[0041] Ahora se ha determinado que la actividad de PI3K δ se puede inhibir selectiva o específicamente para facilitar el tratamiento de una enfermedad mediada por PI3K δ al tiempo que se reducen o eliminan las complicaciones que generalmente están asociadas con la inhibición concomitante de la actividad de otras PI 3-quinasas de Clase I. Para ilustrar esta realización, los métodos de la invención se pueden practicar usando miembros de una clase de compuestos que se ha encontrado que exhiben una inhibición selectiva de PI3K δ con respecto a otras isoformas de PI3K.

[0042] Los métodos preferidos emplean compuestos que se han determinado empíricamente para exhibir al menos 10 veces la inhibición selectiva de PI3K δ en relación con otras isoformas de PI3K. Por ejemplo, los métodos se pueden practicar usando los siguientes compuestos:

2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-isopropilfenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-bifenilo-2-ilo-5-cloro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-fluorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-8-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-bencilo-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-morfolina-4-ilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-isopropilfenilo)-3H-quinazolina-4-ona; y
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona.

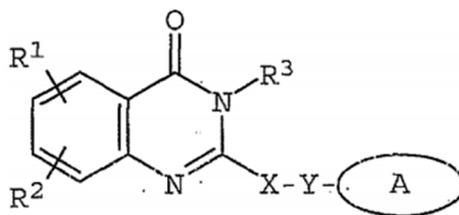
[0043] Además, se ha determinado que los métodos descritos aquí se pueden practicar ventajosamente utilizando miembros de una clase de compuestos que exhiben actividad inhibidora PI3K δ , facilitando de este modo inhibiciones de actividad PI3K δ en enfermedades mediadas por el mismo. Por ejemplo, los métodos pueden emplear los siguientes compuestos:

2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-isopropilfenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-bifenilo-2-ilo-t-cloro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-fluorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-8-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-bencilo-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-morfolina-4-ilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetil)-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;

2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-6-bromo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona; y
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-metoxifenilo)-3H-quinazolina-4-ona.

[0044] La invención proporciona además compuestos que son inhibidores selectivos de PI3K™ actividad. Los compuestos exhiben inhibición de PI3K™ en ensayos bioquímicos y alteran selectivamente la función de las células que expresan PI3K™ en ensayos basados en células. Como se describe en otra parte del presente documento, se ha demostrado que los compuestos de la invención inhiben ciertas funciones en neutrófilos y otros leucocitos, así como funciones de osteoclastos.

[0045] En general, los compuestos proporcionados por la invención tienen la estructura general (I):



(I)

en la que A, X, Y, R¹, R², y R³ son como se definen anteriormente, y sales y solvatos (por ejemplo, hidratos) de los mismos aceptables.

[0046] Tal como se utiliza aquí, el término "alquilo" incluye cadena lineal y grupos de hidrocarburos ramificados que contienen el número indicado de átomos de carbono, típicamente metilo, etilo y grupos propilo y butilo de cadena lineal y ramificada. El grupo hidrocarbonado puede contener hasta 16 átomos de carbono, preferiblemente de uno a ocho átomos de carbono. El término "alquilo" incluye "alquilo puenteado", es decir, a C₆-C₁₆ grupo hidrocarburo bicíclico o policíclico, por ejemplo, norbornilo, adamantilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[2.2.1]heptilo, biciclo[3.2.1]octilo o decahidronaftilo. El término "cicloalquilo" se define como una grupo cíclico C₃-C₈ hidrocarburo, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo y ciclopentilo.

[0047] El término "alqueno" se define idénticamente como "alquilo", a excepción de que contiene un doble enlace carbono-carbono. "Cicloalqueno" se define de manera similar al cicloalquilo, excepto que un doble enlace carbono-carbono está presente en el anillo.

[0048] El término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo que tiene un sustituyente. Por ejemplo, el término "C₁₋₃ alquilearilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene de uno a tres átomos de carbono, y está sustituido con un grupo arilo.

[0049] El término "halo" o "halógeno" se define aquí para incluir flúor, bromo, cloro y yodo.

[0050] El término "haloalquilo" se define aquí como un grupo alquilo sustituido con uno o más sustituyentes halo, ya sea fluoro, cloro, bromo, yodo, o combinaciones de los mismos. De forma similar, "halocicloalquilo" se define como un grupo cicloalquilo que tiene uno o más sustituyentes halo.

[0051] El término "arilo", solo o en combinación, se define aquí como un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferiblemente un grupo aromático monocíclico o bicíclico, por ejemplo, fenilo o naftilo. A menos que se indique lo contrario, un grupo "arilo" puede estar no sustituido o sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular uno a tres, halo, alquilo, fenilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinito y alquilsulfonilo. Los grupos arilo ejemplares incluyen fenilo, naftilo, bifenilo, tetrahidronaftilo, clorofenilo, fluorofenilo, aminofenilo, metilfenilo, metoxifenilo, trifluorometilfenilo, nitrofenilo y carboxifenilo.

[0052] Los términos "arilalquilo 1-3 alquilo" y "heteroarilo-C₁₋₃alquilo" se definen como un grupo arilo o heteroarilo que tiene un sustituyente C₁₋₃alquilo.

[0053] El término "heteroarilo" se define aquí como un sistema anular monocíclico o bicíclico que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un nitrógeno, oxígeno, o un átomo de azufre en un anillo aromático, y que puede estar no sustituido o sustituido, por ejemplo, con uno o más, y en particular uno a tres, sustituyentes, como halo, alquilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, alcoxialquilo, haloalquilo, nitro, amino, alquilamino, acilamino, alquiltio, alquilsulfinito y alquilsulfonilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen tienilo, furilo, piridilo, oxazolilo, quinolilo,

isoquinolilo, indolilo, triazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, benzotiazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, tiazolilo y tiadiazolilo.

5 **[0054]** El término "Het" se define como grupos monocíclicos, bicíclicos, y tricíclicos que contienen uno o más heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno, y azufre. Un grupo "Het" también puede contener un grupo oxo (=O) unido al anillo. Ejemplos no limitantes de grupos Het incluyen 1,3-dioxolano, 2-pirazolina, pirazolidina, pirrolidina, piperazina, una pirrolina, 2H-pirano, 4H-pirano, morfolina, tiofolina, piperidina, 1,4-ditiano y 1,4-dioxano.

10 **[0055]** El término "hidroxi" se define como -OH.

[0056] El término "alcoxi" se define como -OR, donde R es alquilo.

15 **[0057]** El término "alcoxialquilo" se define como un grupo alquilo en el que un hidrógeno ha sido reemplazado por un grupo alcoxi. El término "(alquiltio)alquilo" se define de manera similar como alcoxialquilo, excepto que está presente un átomo de azufre, en lugar de un átomo de oxígeno.

[0058] El término "hidroxialquilo" se define como un grupo hidroxilo unido a un grupo alquilo.

20 **[0059]** El término "amino" se define como -NH₂, y el término "alquilamino" se define como -NR₂, en el que al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno.

[0060] El término "acilamino" se define como RC(=O)N, donde R es alquilo o arilo.

25 **[0061]** El término "alquiltio" se define como -SR, donde R es alquilo.

[0062] El término "alquilsulfinilo" se define como R-SO₂, en el que R es alquilo.

30 **[0063]** El término "amino" se define como -NH₂, y el término "alquilamino" se define como -NR₂, en el que al menos un R es alquilo y el segundo R es alquilo o hidrógeno.

[0064] El término "acilamino" se define como RC(=O)N, donde R es alquilo o arilo.

35 **[0065]** El término "alquiltio" se define como -SR, donde R es alquilo.

[0066] El término "alquilsulfinilo" se define como R-SO₂, en el que R es alquilo.

[0067] El término "alquilsulfonilo" se define como R-SO₃, en el que R es alquilo.

40 **[0068]** El término "nitro" se define como -NO₂.

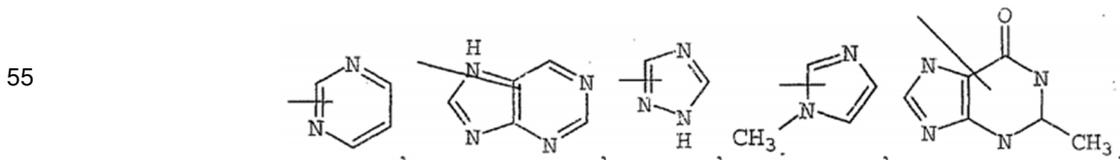
[0069] El término "trifluorometilo" se define como -CF₃.

45 **[0070]** El término "trifluorometoxi" se define como -OCF₃.

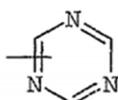
[0071] El término "ciano" se define como -CN.

50 **[0072]** En realizaciones preferidas, X se selecciona del grupo que consiste en CH₂, CH₂CH₂, CH=CH, CH(CH₃), CH₂CH(CH₃), y C(CH₃)₂.

[0073] A está representado por un sistema de anillo opcionalmente sustituido seleccionado del grupo que consiste de

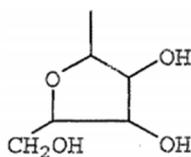


60 y



[0074] El sistema de anillo A puede estar opcionalmente sustituido con uno a tres, y preferiblemente uno a dos, sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en $N(R^a)_2$, halo, C_{1-3} alquilo, $S(C_{1-3}$ alquilo), OR^a , y

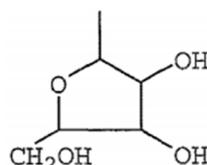
5



10

los sustituyentes específicos incluyen, pero no se limitan a, NH_2 , $NH(CH_3)$, $N(CH_3)_2$, $NHCH_2C_6H_5$, $NH(C_2H_5)$, Cl, F, CH_3 , SCH_3 , OH, y

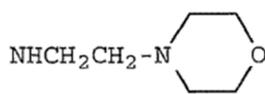
15



20

[0075] R^1 y R^2 , independientemente, están representados por hidrógeno, OR^a , halo, C_{1-6} alquilo, CF_3 , NO_2 , $N(R^a)_2$, NR^aC_{1-3} alquilenon $(R^a)_2$ y alquilenon $OC_{1-3}OR^a$. Sustituyentes específicos incluyen, pero no están limitados a, H, OCH_3 , Cl, Br, F, CH_3 , CF_3 , NO_2 , OH, N $(CH_3)_2$,

25

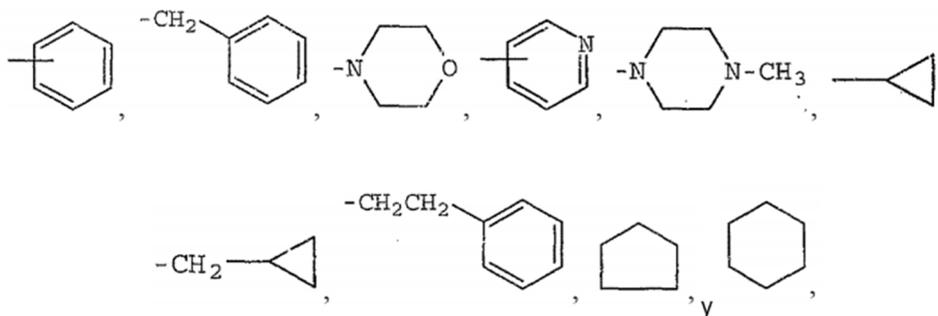


30

y $O(CH_2)_2OCH_2C_6H_5$. R^1 y R^2 también pueden tomarse juntos para formar un anillo, por ejemplo, un anillo de fenilo.

[0076] R^3 se selecciona del grupo que consiste en

35



40

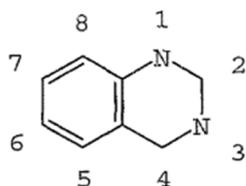
45

[0077] El grupo R^3 puede estar sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de halo, OR^a , C_{1-6} alquilo, arilo, heteroarilo, NO_2 , $N(R^a)_2$, $NR^aSO_2CF_3$, $NR^aC(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, $N(R^a)C_{1-4}$ alquilenon $(R^a)_2$, $SO_2N(R^a)_2$, CN, $C(=O)R^a$, C_{1-4} alquilenon $(R^a)_2$ y OC_{1-4} alquilenon $(R^a)_2$. Los sustituyentes específicos para el grupo R^3 incluyen, entre otros, Cl, F, CH_3 , $CH(CH_3)_2$, OCH_3 , C_6H_5 , NO_2 , NH_2 , $NHC(=O)CH_3$, CO_2H y $N(CH_3)CH_2CH_2N(CH_3)_2$.

50

[0078] Como se usa en este documento, la estructura del anillo de quinazolina, y la numeración de la estructura del anillo, es

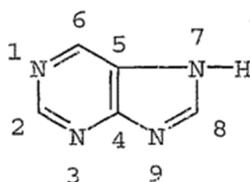
55



60

La estructura de anillo de purina, y la numeración de la estructura del anillo, es

65



[0079] Los compuestos proporcionados por la invención se ejemplifican como sigue:

2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-isopropilfenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-bifenilo-2-ilo-5-cloro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-fluorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-8-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-bencilo-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-morfolina-4-ilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-6-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-6-bromo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona; y
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-metoxifenilo)-3H-quinazolina-4-ona.

[0080] Los compuestos preferidos proporcionados por la invención son los siguientes:

2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-isopropilfenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-bifenilo-2-ilo-5-cloro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-fluorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-8-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-bencilo-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-morfolina-4-ilo-3H-quinazolina-4-ona;
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona; y
 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona

[0081] El término "profármaco" como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* en un compuesto que tiene la fórmula estructural (I) anterior, por ejemplo, por hidrólisis. El diseño del profármaco se trata generalmente en Hardma et al. (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, novena edición, págs. 11-16 (1996). Se proporciona una discusión exhaustiva en Higuchi et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, vol. 14, ASCD Symposium Series, y en Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press (1987). Brevemente, la administración de un medicamento es seguida por la eliminación del cuerpo o alguna biotransformación mediante la cual la actividad biológica del medicamento se reduce o elimina. Alternativamente, un proceso de biotransformación puede conducir a un subproducto metabólico, que en sí mismo es más activo o igualmente activo en comparación con el medicamento administrado inicialmente. Una mayor comprensión de estos procesos de biotransformación permite el diseño de los llamados "profármacos", que, después de una biotransformación, se vuelven más fisiológicamente activos en su estado alterado. Los profármacos, por lo tanto, abarcan compuestos farmacológicamente inactivos que se convierten en metabolitos biológicamente activos.

[0082] Para ilustrar, los profármacos pueden convertirse en una forma farmacológicamente activa a través de la hidrólisis de, por ejemplo, un enlace éster o amida, introduciendo o exponiendo así un grupo funcional en el producto resultante. Los profármacos pueden diseñarse para reaccionar con un compuesto endógeno para formar un conjugado soluble en agua que mejora aún más las propiedades farmacológicas del compuesto, por ejemplo, una vida media circulatoria incrementada. Alternativamente, los profármacos pueden diseñarse para sufrir modificaciones covalentes en un grupo funcional con, por ejemplo, ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. El conjugado resultante puede inactivarse y excretarse en la orina, o hacerse más potente que el compuesto original. Los conjugados

de alto peso molecular también pueden excretarse en la bilis, someterse a una escisión enzimática y liberarse nuevamente en la circulación, aumentando así la vida media biológica del compuesto administrado originalmente.

Métodos para identificar reguladores negativos de la actividad de PI3Kδ

[0083] La proteína PI3Kδ, así como sus fragmentos que poseen actividad biológica, se pueden usar para seleccionar compuestos reguladores negativos putativos en cualquiera de una variedad de técnicas de detección de fármacos. Un regulador negativo de PI3Kδ es un compuesto que disminuye o elimina la capacidad de PI3Kδ para llevar a cabo cualquiera de sus funciones biológicas. Un ejemplo de tales compuestos es un agente que disminuye la capacidad de un polipéptido PI3Kδ para fosforilar fosfatidilinositol o para dirigir estructuras apropiadas dentro de una célula. La selectividad de un compuesto que regula negativamente la actividad de PI3Kδ se puede evaluar comparando su actividad en PI3Kδ con su actividad en otras proteínas. Los reguladores negativos selectivos incluyen, por ejemplo, anticuerpos y otras proteínas o péptidos que se unen específicamente a un polipéptido PI3Kδ, oligonucleótidos que se unen específicamente a polipéptidos PI3Kδ y otros compuestos no peptídicos (por ejemplo, moléculas orgánicas aisladas o sintéticas) que interactúan específicamente con polipéptidos PI3Kδ. Los reguladores negativos también incluyen compuestos como los descritos anteriormente, pero que interactúan con una pareja de unión específico de polipéptidos PI3Kδ.

[0084] Los objetivos actualmente preferidos para el desarrollo de reguladores negativos selectivos de PI3Kδ incluyen, por ejemplo:

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

Por ejemplo, un objetivo para el desarrollo de moduladores es la interacción reguladora identificada de p85 con p110δ, que puede estar implicada en la activación y/o localización subcelular del resto p110δ. Todavía otros moduladores selectivos incluyen aquellos que reconocen secuencias de nucleótidos reguladoras específicas o que codifican PI3Kδ. Los moduladores de la actividad de PI3Kδ pueden ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades y afecciones fisiológicas en las que está involucrada la actividad aberrante de PI3Kδ.

[0085] Por consiguiente, la descripción proporciona métodos para caracterizar la potencia de un compuesto de prueba como un inhibidor del polipéptido PI3Kδ, comprendiendo dicho método las etapas de (a) medir la actividad de un polipéptido PI3Kδ en presencia de un compuesto de prueba; (b) comparar la actividad del polipéptido PI3Kδ en presencia del compuesto de prueba con la actividad del polipéptido PI3Kδ en presencia de una cantidad equivalente de un compuesto de referencia (por ejemplo, un compuesto inhibidor de PI3Kδ de la invención como se describe en este documento), en donde una actividad menor del polipéptido PI3Kδ en presencia del compuesto de prueba que en presencia de la referencia indica que el compuesto de prueba es un inhibidor más potente que el compuesto de referencia, y una mayor actividad del polipéptido PI3Kδ en presencia del compuesto de prueba que en presencia de la referencia indica que el compuesto de prueba es un inhibidor menos potente que el compuesto de referencia.

[0086] La descripción proporciona además métodos para caracterizar la potencia de un compuesto de prueba como un inhibidor del polipéptido PI3Kδ, que comprende los pasos de (a) determinar una cantidad de un compuesto de control (por ejemplo, un compuesto inhibidor de PI3Kδ de la invención como se describe aquí) que inhibe una actividad de un polipéptido PI3Kδ por un porcentaje de inhibición de referencia, definiendo así una cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de control; (b) determinar una cantidad de un compuesto de prueba que inhibe la actividad de un polipéptido PI3Kδ por un porcentaje de inhibición de referencia, definiendo así una cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de prueba; (c) comparar la cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de prueba con la cantidad inhibidora de referencia para el compuesto de control, en donde una cantidad inhibidora de referencia más baja para el compuesto de prueba que para el compuesto de control indica que el compuesto de prueba es un inhibidor más potente que el compuesto de control, y una cantidad inhibidora de referencia más alta para el compuesto de prueba que para el compuesto de control indica que el compuesto de prueba es un inhibidor menos potente que el compuesto de control. En un aspecto, el método usa una cantidad inhibidora de referencia que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido PI3Kδ en un 50%, 60%, 70% u 80%. En otro aspecto, el método emplea una cantidad inhibidora de referencia, que es la cantidad del compuesto que inhibe la actividad del polipéptido PI3Kδ en un 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 basado en células *in vitro* o en un ensayo *in vivo*.

[0087] La descripción proporciona además métodos para identificar un regulador negativo de la actividad de PI3Kδ, que comprende los pasos de (i) medir la actividad de un polipéptido PI3Kδ en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, e (ii) identificar como un regulador negativo un compuesto de prueba que disminuye la actividad de PI3Kδ y que compite con un compuesto de la invención para unirse a PI3Kδ. Además, la invención proporciona métodos para

identificar compuestos que inhiben la actividad de PI3K δ , que comprende los pasos de (i) poner en contacto un polipéptido de PI3K δ con un compuesto de la invención en presencia y ausencia de un compuesto de prueba, y (ii) identificar un compuesto de prueba como un regulador negativo de la actividad de PI3K δ en donde el compuesto compete con un compuesto de la invención para unirse a PI3K δ . Por lo tanto, la invención proporciona un método para seleccionar reguladores negativos candidatos de la actividad de PI3K δ y/o para confirmar el modo de acción de dichos reguladores negativos candidatos. Dichos métodos pueden emplearse contra otras isoformas de PI3K en paralelo para establecer la actividad comparativa del compuesto de prueba a través de las isoformas y/o en relación con un compuesto de la invención.

[0088] En estos métodos, el polipéptido PI3K δ puede ser un fragmento de p110 δ que muestra actividad quinasa, es decir, un fragmento que comprende el sitio catalítico de p110 δ . Alternativamente, el polipéptido PI3K δ puede ser un fragmento del dominio de unión a p110 δ de p85 y proporciona un método para identificar moduladores alostéricos de PI3K δ . Los métodos pueden emplearse en células que expresan células que expresan PI3K δ o sus subunidades, ya sea de manera endógena o exógena. Por consiguiente, el polipéptido empleado en tales métodos puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, modificado para visualizarse en una superficie celular, o localizado intracelularmente. Se puede medir la modulación de la actividad o la formación de complejos de unión entre el polipéptido PI3K δ y el agente que se está probando.

[0089] Los polipéptidos PI3K humanos son susceptibles de ensayos bioquímicos o de detección de alto rendimiento basados en células (HTS) de acuerdo con los métodos conocidos y practicados en la técnica, incluidos los sistemas de análisis de melanóforos para investigar las interacciones receptor-ligando, los sistemas de análisis basados en levaduras y los sistemas de expresión de células de mamíferos. Para una revisión, ver Jayawickreme y Kost, *Curr Opin Biotechnol*, 8: 629-34 (1997). Los ensayos de HTS automatizados y miniaturizados también se comprenden como se describe, por ejemplo, en Houston y Banks, *Curr Opin Biotechnol*, 8: 734-40 (1997).

[0090] Dichos ensayos HTS se usan para seleccionar bibliotecas de compuestos para identificar compuestos particulares que exhiben una propiedad deseada. Se puede usar cualquier biblioteca de compuestos, incluidas las bibliotecas químicas, las bibliotecas de productos naturales y las bibliotecas combinatorias que comprenden oligopéptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos aleatorios o diseñados.

[0091] Las bibliotecas químicas pueden contener compuestos conocidos, análogos estructurales patentados de compuestos conocidos o compuestos que se identifican a partir de la selección de productos naturales.

[0092] Las bibliotecas de productos naturales son colecciones de materiales aislados de fuentes naturales, típicamente, microorganismos, animales, plantas u organismos marinos. Los productos naturales se aíslan de sus fuentes por fermentación de microorganismos, seguido de aislamiento y extracción de los caldos de fermentación o por extracción directa de los microorganismos o tejidos (plantas o animales). Las bibliotecas de productos naturales incluyen policétidos, péptidos no ribosómicos y variantes (incluidas variantes que no se producen de forma natural) de los mismos. Para una revisión, ver Cane et al., *Science*, 282: 63-68 (1998).

[0093] Las bibliotecas combinatorias se componen de grandes cantidades de compuestos relacionados, como péptidos, oligonucleótidos u otros compuestos orgánicos como una mezcla. Dichos compuestos son relativamente fáciles de diseñar y preparar mediante protocolos de síntesis automatizados tradicionales, PCR, clonación o métodos sintéticos patentados. De particular interés son las bibliotecas combinatorias de péptidos y oligonucleótidos.

[0094] Aún otras bibliotecas de interés incluyen péptidos, proteínas, peptidomiméticos, colecciones sintéticas multiparalelas, bibliotecas recombinantes y de polipéptidos. Para una revisión de la química combinatoria y las bibliotecas creadas de ese modo, ver Myers, *Curr Opin Biotechnol*, 8: 701-07 (1997).

[0095] Una vez que se han identificado compuestos que muestran actividad como reguladores negativos de la función PI3K δ , se puede llevar a cabo un programa de optimización en un esfuerzo por mejorar la potencia y/o selectividad de la actividad. Este análisis de las relaciones estructura-actividad (SAR) típicamente involucra series iterativas de modificaciones selectivas de estructuras compuestas y su correlación con la actividad bioquímica o biológica. Se pueden diseñar familias de compuestos relacionados que exhiban la actividad deseada, con ciertos miembros de la familia, a saber, aquellos que poseen perfiles farmacológicos adecuados, que potencialmente califican como candidatos terapéuticos.

Usos terapéuticos de inhibidores de la actividad de PI3K δ

[0096] Los compuestos de la invención pueden ser empleados en un método para inhibir selectiva o específicamente la actividad de PI3K δ terapéutica o profilácticamente. El método comprende administrar un inhibidor selectivo o específico de la actividad de PI3K δ en una cantidad efectiva para el mismo. Este método puede emplearse en el tratamiento de humanos o animales que están o pueden estar sujetos a cualquier condición cuyos síntomas o patología estén mediados por la expresión o actividad de PI3K δ .

[0097] "Tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a prevenir que ocurra un trastorno en un

animal que puede estar predispuesto al trastorno, pero que aún no se ha diagnosticado que lo tiene; inhibir el trastorno, es decir, detener su desarrollo; aliviar el trastorno, es decir, causar su regresión; o mejorar el trastorno, es decir, reducir la gravedad de los síntomas asociados con el trastorno. "Trastorno" está destinado a abarcar trastornos médicos, enfermedades, afecciones y síndromes, sin limitación.

5 **[0098]** Los métodos abarcan varios modos de tratar a un sujeto animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un primate, y aún más preferiblemente un ser humano. Entre los animales mamíferos que pueden tratarse se encuentran, por ejemplo, los animales de compañía (mascotas), incluidos perros y gatos; animales de granja, incluidos ganado vacuno, caballos, ovejas, cerdos y cabras; animales de laboratorio, incluidas ratas, ratones, conejos, cobayas y primates no humanos, y especímenes de zoológicos. Los animales no mamíferos incluyen, por ejemplo, aves, peces, reptiles y anfibios.

15 **[0099]** En un aspecto, el método de la invención puede emplearse para tratar sujetos terapéutica o profilácticamente que tienen o pueden estar sujetos a un trastorno inflamatorio. Un aspecto de la presente invención deriva de la participación de PI3Kδ en los aspectos mediadores del proceso inflamatorio. Sin tener la intención de estar sujeto a ninguna teoría, se teoriza que, debido a que la inflamación involucra procesos típicamente mediados por la activación de leucocitos (por ejemplo, neutrófilos, linfocitos, etc.) y la transmigración quimiotáctica, y porque PI3Kδ puede mediar tales fenómenos, los antagonistas de PI3Kδ pueden ser utilizados para suprimir lesiones asociadas con inflamación.

20 **[0100]** El "trastorno inflamatorio", como se usa en el presente documento, puede referirse a cualquier enfermedad, trastorno o síndrome en donde una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño al tejido del huésped o pérdida de la función del tejido. El "trastorno inflamatorio" también se refiere a un estado patológico mediado por la afluencia de leucocitos y/o quimiotaxis de neutrófilos.

25 **[0101]** La "inflamación" tal como se usa en el presente documento se refiere a una respuesta protectora localizada provocada por lesión o destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o tapar (secuestrar) tanto el agente perjudicial como el tejido lesionado. La inflamación se asocia notablemente con la afluencia de leucocitos y/o quimiotaxis de neutrófilos. La inflamación puede ser el resultado de la infección con organismos y virus patógenos y de medios no infecciosos como trauma o reperusión después de un infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, respuesta inmune a antígeno extraño y respuestas autoinmunes. Por consiguiente, los trastornos inflamatorios susceptibles de la invención abarcan trastornos asociados con reacciones del sistema de defensa específico así como con reacciones del sistema de defensa inespecífico.

35 **[0102]** Como se usa en el presente documento, el término "sistema de defensa específico" se refiere al componente del sistema inmune que reacciona a la presencia de antígenos específicos. Los ejemplos de inflamación resultante de una respuesta del sistema de defensa específico incluyen la respuesta clásica a antígenos extraños, enfermedades autoinmunes y respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado mediada por células T. Las enfermedades inflamatorias crónicas, el rechazo de tejidos y órganos trasplantados sólidos, por ejemplo, trasplantes de riñón y médula ósea, y la enfermedad de injerto contra huésped (EICH), son ejemplos adicionales de reacciones inflamatorias del sistema de defensa específico.

45 **[0103]** Como se usa en el presente documento, el término "sistema de defensa inespecífico" se refiere a trastornos inflamatorios mediados por leucocitos que son incapaces de memoria inmunológica (por ejemplo, granulocitos y macrófagos). Los ejemplos de inflamación que resultan de una reacción del sistema de defensa inespecífico incluyen inflamación asociada con afecciones tales como el síndrome de dificultad respiratoria (SDRA) para adultos o síndromes de lesiones de múltiples órganos; lesión por reperusión; glomerulonefritis aguda; artritis reactiva; dermatosis con componentes inflamatorios agudos; meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central tales como accidente cerebrovascular; lesión térmica; enfermedad inflamatoria intestinal; síndromes asociados a transfusiones de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas.

50 **[0104]** "Enfermedad autoinmune", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier grupo de trastornos en los que la lesión tisular se asocia con respuestas humorales o mediadas por células a los propios constituyentes del cuerpo. "Enfermedad alérgica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier síntoma, daño tisular o pérdida de la función tisular resultante de la alergia. "Enfermedad artrítica", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier enfermedad que se caracteriza por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a una variedad de etiologías. "Dermatitis", como se usa en el presente documento, 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. El "rechazo de trasplante", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier reacción inmune dirigida contra tejido injertado, tal como órganos o células (por ejemplo, médula ósea), caracterizada por una pérdida de la función de los tejidos injertados y circundantes, dolor, hinchazón, leucocitosis y trombocitopenia.

65 **[0105]** Los métodos terapéuticos de la presente invención incluyen métodos para el tratamiento de trastornos asociados con la activación de células inflamatorias. La "activación celular inflamatoria" se refiere a la inducción por un estímulo (que incluye, pero no se limita a, citocinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (que incluyen pero no se limitan a citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanoïdes o aminos vasoactivas), o la expresión en la superficie celular de un número nuevo o aumentado

de mediadores (incluidos, entre otros, antígenos de histocompatibilidad principales o moléculas de adhesión celular) en células inflamatorias (incluidos, entre otros, monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos (es decir, leucocitos polimorfonucleares como neutrófilos, basófilos y eosinófilos), mastocitos, células dendríticas, células de Langerhans y células endoteliales). Los expertos en la materia apreciarán que la activación de uno o una combinación de estos fenotipos en estas células puede contribuir al inicio, perpetuación o exacerbación de un trastorno inflamatorio.

[0106] Se ha encontrado que los compuestos de la invención inhiben la liberación de superóxido por los neutrófilos. Los neutrófilos liberan superóxido en respuesta a cualquiera de una variedad de estímulos, incluidas las señales de infección, como un mecanismo de destrucción celular. Por ejemplo, se sabe que la liberación de superóxido es inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que es liberado por macrófagos, mastocitos y linfocitos al entrar en contacto con componentes bacterianos de la pared celular como el lipopolisacárido (LPS). TNF α es un activador extraordinariamente potente y promiscuo de procesos inflamatorios, que participa en la activación de neutrófilos y varios otros tipos de células, inducción de adhesión de leucocitos/células endoteliales, pirexia, producción mejorada de MHC de clase I y estimulación de la angiogénesis. Alternativamente, la liberación de superóxido puede ser estimulada por formilo-Met-Leu-Phe (fMLP) u otros péptidos bloqueados en el extremo N por metionina formilada. Tales péptidos normalmente no se encuentran en los eucariotas, pero son fundamentalmente característicos de las bacterias y señalan la presencia de bacterias al sistema inmune. Los leucocitos que expresan el receptor fMLP, por ejemplo, neutrófilos y macrófagos, son estimulados para migrar gradientes de estos péptidos (es decir, quimiotaxis) hacia los loci de infección. Como se demuestra aquí, los compuestos de la invención inhiben la liberación estimulada de estróxido por los neutrófilos en respuesta a TNF α o fMLP. También se ha demostrado que otras funciones de los neutrófilos, incluida la exocitosis estimulada y la migración quimiotáctica dirigida, son inhibidas por los inhibidores de PI3K δ de la invención. Por consiguiente, se puede esperar que los compuestos de la invención sean útiles en el tratamiento de trastornos, tales como trastornos inflamatorios, que están mediados por cualquiera o todas estas funciones de neutrófilos.

[0107] La presente invención permite métodos para tratar enfermedades tales como enfermedades artríticas, tales como artritis reumatoide, artritis monoarticular, osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis; enfermedad de Behcet; sepsis, shock séptico, shock endotóxico, sepsis gram negativa, sepsis gram positiva y síndrome de shock tóxico; síndrome de lesión de múltiples órganos secundario a septicemia, trauma o hemorragia; trastornos oftálmicos tales como conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, uveítis y oftalmopatía asociada a tiroides; granuloma ecsinofílico; trastornos pulmonares o respiratorios como asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica, SDRA, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (p. ej., enfermedad pulmonar obstructiva crónica), silicosis, sarcoidosis pulmonar, pleuresía, alveolitis, vasculitis, enfisema, neumonía, bronquiectasias y toxicidad pulmonar por oxígeno; lesión por reperfusión del miocardio, cerebro o extremidades; fibrosis tal como fibrosis quística; formación queloide o formación de tejido cicatricial; aterosclerosis; enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico (LES), tiroiditis autoinmune, esclerosis múltiple, algunas formas de diabetes y síndrome de Reynaud; y trastornos de rechazo de trasplante tales como GVHD y rechazo de aloinjerto; glomerulonefritis crónica; enfermedades inflamatorias del intestino tales como enfermedad inflamatoria intestinal crónica (CIBD), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enterocolitis necrotizante; dermatosis inflamatorias tales como dermatitis de contacto, dermatitis atópica, psoriasis o urticaria; fiebre y mialgias por infección; trastornos inflamatorios del sistema nervioso central o periférico tales como meningitis, encefalitis y lesiones cerebrales o de la médula espinal debido a un traumatismo menor; síndrome de Sjogren; enfermedades que involucran diapedesis leucocitaria; hepatitis alcohólica; neumonía bacteriana; enfermedades mediadas por el complejo antígeno-anticuerpo; shock hipovolémico; diabetes mellitus tipo I; hipersensibilidad aguda y retardada; estados de enfermedad debidos a discrasia de leucocitos y metástasis; lesión térmica; síndromes asociados a transfusiones de granulocitos; y toxicidad inducida por citoquinas.

[0108] El método puede tener utilidad en el tratamiento de sujetos que están o pueden estar sujetos a lesión por reperfusión, es decir, lesión resultante de situaciones en las que un tejido u órgano experimenta un período de isquemia seguido de reperfusión. El término "isquemia" se refiere a la anemia tisular localizada debido a la obstrucción de la entrada de sangre arterial. La isquemia transitoria seguida de reperfusión característicamente resulta en la activación y transmigración de neutrófilos a través del endotelio de los vasos sanguíneos en el área afectada. La acumulación de neutrófilos activados a su vez da como resultado la generación de metabolitos reactivos de oxígeno, que dañan los componentes del tejido u órgano involucrado. Este fenómeno de "lesión por reperfusión" se asocia comúnmente con afecciones como accidente cerebrovascular vascular (incluida la isquemia global y focal), shock hemorrágico, isquemia o infarto de miocardio, trasplante de órganos y vasoespasmos cerebrales. Para ilustrar, la lesión por reperfusión ocurre al finalizar los procedimientos de derivación cardíaca o durante un paro cardíaco cuando el corazón, una vez que se le impide recibir sangre, comienza a reperfundir. Se espera que la inhibición de la actividad de PI3K δ dé como resultado cantidades reducidas de lesión por reperfusión en tales situaciones.

[0109] 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 ser el resultado de un paro cardíaco. La isquemia focal se produce cuando una parte del cerebro se ve privada de su suministro de sangre normal. La isquemia focal puede resultar de la oclusión tromboembólica de un vaso cerebral, traumatismo craneoencefálico, edema o tumor cerebral. Incluso si es transitoria, tanto la isquemia global como la focal pueden causar daño neuronal generalizado. Aunque el daño al tejido nervioso se produce durante horas o incluso días después del inicio de la isquemia, se puede desarrollar algo de daño permanente en el tejido nervioso en los minutos iniciales después del cese del flujo sanguíneo al cerebro.

5 [0110] La isquemia también puede ocurrir en el corazón por infarto de miocardio y otros trastornos cardiovasculares en los que las arterias coronarias se han obstruido como resultado de aterosclerosis, trombos o espasmos. Por consiguiente, se cree que la invención es útil para tratar el daño del tejido cardíaco, particularmente el daño resultante de la isquemia cardíaca o causado por una lesión por reperfusión en mamíferos.

10 [0111] En otro aspecto, los inhibidores selectivos de la actividad de PI3K δ , tales como los compuestos de la invención, pueden emplearse en métodos de tratamiento de enfermedades óseas, especialmente enfermedades en las que la función osteoclástica es anormal o indeseable. Como se muestra en el Ejemplo 6', a continuación, los compuestos de la invención inhiben la función osteoclástica *in vitro*. Por consiguiente, el uso de tales compuestos y otros inhibidores selectivos de PI3K δ puede ser valioso en el tratamiento de la osteoporosis, la enfermedad de Paget y los trastornos de resorción ósea relacionados.

15 [0112] En un aspecto adicional, los compuestos inhibidores de PI3K δ de la invención son útiles en métodos para inhibir el crecimiento o la proliferación de células cancerosas de origen hematopoyético, preferiblemente células cancerosas de origen linfoide, y más preferiblemente células cancerosas relacionadas o derivadas de linfocitos B o progenitores de linfocitos B. Los cánceres susceptibles de tratamiento usando el método de la invención incluyen, sin limitación, linfomas, por ejemplo, neoplasias malignas de tejidos linfoides y reticuloendoteliales, tales como linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, linfomas linfocíticos y similares; mielomas múltiples; así como leucemias tales como leucemias linfocíticas, leucemias mieloides crónicas (mielógenas) y similares. En una realización preferida, los compuestos inhibidores de PI3K δ pueden usarse para inhibir o controlar el crecimiento o la proliferación de células de leucemia mieloide crónica (mielógena).

25 [0113] En otro aspecto, la invención incluye un método para suprimir una función de basófilos y/o mastocitos, y de ese modo permitir el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una actividad excesiva o indeseable de basófilos y/o mastocitos. De acuerdo con el método, puede usarse un compuesto de la invención que inhibe selectivamente la expresión o actividad de fosfatidilinositol 3-quinasa delta (PI3K δ) en los basófilos y/o mastocitos. Preferiblemente, el método emplea un inhibidor de PI3K δ en una cantidad suficiente para inhibir la liberación de histamina estimulada por los basófilos y/o mastocitos. Por consiguiente, el uso de tales compuestos y otros inhibidores selectivos de PI3K δ puede ser valioso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la liberación de histamina, es decir, trastornos alérgicos, incluidos trastornos tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, SDRA, enfisema y trastornos relacionados.

35 **Composiciones farmacéuticas de inhibidores de la actividad de PI3K δ**

40 [0114] Un compuesto de la presente invención puede administrarse como el producto químico puro, pero típicamente es preferible administrar el compuesto en forma de una composición o formulación farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto químico o biológico ("agente") que es activo como un modulador de la actividad de PI3K δ y un vehículo, adyuvante o vehículo farmacéutico biocompatible. La composición puede incluir el agente como el único resto activo o en combinación con otros agentes, tales como oligo o polinucleótidos, oligo o polipéptidos, fármacos u hormona mezclados con excipiente(s) u otros vehículos farmacéuticamente aceptables. Los portadores y otros ingredientes pueden considerarse farmacéuticamente aceptables en la medida en que sean compatibles con otros ingredientes de la formulación y no perjudiciales para el receptor de los mismos.

45 [0115] Las técnicas para la formulación y administración de composiciones farmacéuticas se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edición, Mack Publishing Co, Easton, PA, 1990. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar usando cualquier método convencional, por ejemplo, mezclando, disolviendo, procesos de granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento, hilado por fusión, secado por pulverización o liofilización. Sin embargo, la formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la materia dependiendo de la ruta de administración y la dosis deseada. Dichas formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* del agente administrado. Dependiendo de la afección a tratar, estas composiciones farmacéuticas pueden formularse y administrarse sistémicamente o localmente.

50 [0116] Las composiciones farmacéuticas están formuladas para contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, y pueden comprender opcionalmente excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La modalidad de administración generalmente determinará la naturaleza del transportista. Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden comprender soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Los portadores adecuados para la administración parenteral se pueden seleccionar entre solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua y otras soluciones fisiológicamente compatibles. Los portadores preferidos para la administración parenteral son tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, la solución de Ringer o la solución salina tamponada fisiológicamente. Para la administración celular o tisular, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera particular a atravesar. Tales penetrantes son generalmente conocidos

en la técnica. Para preparaciones que comprenden proteínas, la formulación puede incluir materiales estabilizantes, tales como polioles (por ejemplo, sacarosa) y/o tensioactivos (por ejemplo, tensioactivos no iónicos).

[0117] Alternativamente, las formulaciones para uso parenteral pueden comprender dispersiones o suspensiones de los compuestos activos preparados como suspensiones de inyección oleosas apropiadas. Los solventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo y ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados 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 se pueden usar como recubrimientos o estructuras de matriz, por ejemplo, polímeros metacrílicos, como la serie EUDRAGIT® disponible de Röhm America Inc. (Piscataway, NJ). También se pueden usar emulsiones, por ejemplo, dispersiones de aceite en agua y agua en aceite, opcionalmente estabilizadas por un agente emulsionante o dispersante (materiales tensioactivos). Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearilo etoxilados, polioxietileno sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, goma de tragacanto y mezclas de los mismos.

[0118] Los liposomas que contienen el agente activo también pueden emplearse para administración parenteral. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Las composiciones en forma de liposomas también pueden contener otros ingredientes, tales como estabilizantes, conservantes y excipientes.

[0119] Los lípidos preferidos incluyen fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology*, vol. XIV, pág. 33, Academic Press, Nueva York (1976).

[0120] Las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente en dosificaciones adecuadas para administración oral pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Las preparaciones formuladas para administración oral pueden estar en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, grageas, líquidos, geles, jarabes, lodos, elixires, suspensiones o polvos. Para ilustrar, las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar auxiliares adecuados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Las formulaciones orales pueden emplear vehículos líquidos de tipo similar a los descritos para uso parenteral, por ejemplo, soluciones acuosas tamponadas o suspensiones.

[0121] Las formulaciones orales preferidas incluyen tabletas, grageas y cápsulas de gelatina. Estas preparaciones pueden contener uno o más excipientes, que incluyen, sin limitación:

- a) diluyentes, tales como azúcares, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol;
- b) aglutinantes, tales como silicato de aluminio y magnesio, almidón de maíz, trigo, arroz, papa, etc.
- c) materiales de celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, gomas, como goma arábiga y goma de tragacanto, y proteínas, como gelatina y colágeno;
- d) agentes desintegrantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, almidones, agar, ácido alginico o una sal del mismo, 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) aromatizantes y edulcorantes;
- g) colorantes o pigmentos, por ejemplo, para identificar el producto o caracterizar la cantidad (dosis) de compuesto activo; y
- h) otros ingredientes, como conservantes, estabilizantes, agentes de hinchamiento, agentes emulsionantes, promotores de soluciones, sales para regular la presión osmótica y tampones.

[0122] Las cápsulas de gelatina incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas y selladas hechas de gelatina y un recubrimiento como: glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con rellenos, aglutinantes, lubricantes y/o estabilizadores, etc. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en fluidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicol líquido con o sin estabilizadores.

[0123] Los núcleos de grageas se pueden proporcionar con recubrimientos adecuados, como soluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos adecuados o mezclas de solventes.

[0124] La composición farmacéutica se puede proporcionar como una sal del agente activo. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes protónicos acuosos u otros que las formas de ácido o base libre correspondientes. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Los compuestos que contienen restos ácidos pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con cationes adecuados. Los cationes farmacéuticamente

aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, cationes de metales alcalinos (por ejemplo, sodio o potasio) y alcalinotérreos (por ejemplo, calcio o magnesio).

5 [0125] Los compuestos de fórmula estructural (I) que contienen restos básicos pueden formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables con ácidos adecuados. Por ejemplo, Berge et al. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J Pharm Sci, 66: 1 (1977). Las sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido adecuado.

10 [0126] Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforado, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, hidrobromuro, hidroyoduro, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato o sulfato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato de hidrógeno, fosfato o tiocianato fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Los ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido oxálico, ácido maleico, succínico, ácido y ácido cítrico.

20 [0127] A la luz de lo anterior, cualquier referencia a los compuestos de la presente invención que aparecen en el presente documento pretende incluir compuestos de fórmula estructural (I), así como sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de los mismos.

25 [0128] Las sales de adición básicas pueden prepararse in situ durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, o con amoniaco o amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes de amonio y amonio cuaternario no tóxicos que incluyen amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, dietilamonio, trietilamonio y similares. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, y piperazina.

35 [0129] Los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con agentes tales como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; dialquilo sulfatos como dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo sulfatos; haluros de alquilo de cadena larga tales como decilo; cloruros, bromuros y yoduros de laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo tales como bromuros de bencilo y fenetilo; y otros. De este modo se obtienen productos que tienen solubilidad o dispersabilidad modificadas.

40 [0130] Las composiciones que comprenden un compuesto de la invención formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada. Por consiguiente, también se contempla un artículo de fabricación, tal como un recipiente que comprende una forma de dosificación de un compuesto de la invención y una etiqueta que contiene instrucciones para el uso del compuesto. Los kits también se contemplan en la invención. Por ejemplo, el kit puede comprender una forma de dosificación de una composición farmacéutica y un prospecto que contiene instrucciones para el uso de la composición en el tratamiento de una afección médica. En cualquier caso, las condiciones indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de trastornos inflamatorios o cáncer.

Métodos de administración de inhibidores de la actividad de PI3K δ

50 [0131] Las composiciones farmacéuticas que comprenden un inhibidor de la actividad de PI3K δ se pueden administrar al sujeto por cualquier método convencional, que incluye técnicas parenterales y enterales. Las modalidades de administración parenteral incluyen aquellas en las que la composición se administra por una ruta diferente a través del tracto gastrointestinal, por ejemplo, inyecciones intravenosas, intraarteriales, intraperitoneales, intramedulares, intramusculares, intraarticulares, intratecales e intraventriculares. Las modalidades de administración enteral incluyen, por ejemplo, administración oral (incluyendo bucal y sublingual) y rectal. Las modalidades de administración transpitelal incluyen, por ejemplo, la administración transmucosa y la administración transdérmica. La administración transmucosa incluye, por ejemplo, la administración enteral, así como la administración nasal, inhalación y pulmonar profunda; administración vaginal; y administración rectal. La administración transdérmica incluye modalidades transdérmicas o transcutáneas pasivas o activas, que incluyen, por ejemplo, parches y dispositivos de iontoforesis, así como la aplicación tópica de pastas, o ungüentos. La administración parenteral también se puede lograr utilizando una técnica de alta presión, por ejemplo, POWDERJECT®.

60 [0132] Las técnicas quirúrgicas incluyen la implantación de composiciones de depósito (reserva) y bombas osmóticas.

65

5 [0133] Una ruta de administración preferida para el tratamiento de la inflamación puede ser el suministro local o tópico para trastornos localizados como la artritis, o el suministro sistémico para trastornos distribuidos, por ejemplo, el suministro intravenoso para la lesión por reperfusión o para afecciones sistémicas como la septicemia. Para otras enfermedades, incluidas aquellas que involucran el tracto respiratorio, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma y enfisema, la administración se puede lograr por inhalación o administración pulmonar profunda de aerosoles y polvos.

10 [0134] Para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, especialmente leucemias y otros cánceres distribuidos, se prefiere típicamente la administración parenteral. Serían deseables las formulaciones de los compuestos para optimizarlos para la biodistribución después de la administración parenteral. Los compuestos inhibidores de PI3K δ pueden administrarse antes, durante o después de la administración de quimioterapia, radioterapia y/o cirugía.

15 [0135] Además, el índice terapéutico de los compuestos inhibidores de PI3K δ se puede mejorar modificando o derivatizando los compuestos para el suministro dirigido a las células cancerosas que expresan un marcador que identifica a las células como tales. Por ejemplo, los compuestos se pueden unir a un anticuerpo que reconoce un marcador que es selectivo o específico para las células cancerosas, de modo que los compuestos se acercan a las células para ejercer sus efectos localmente, como se describió anteriormente (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 por el tumor de estos compuestos mejora el beneficio terapéutico, entre otras cosas, al minimizar las posibles toxicidades inespecíficas que pueden resultar del tratamiento con radiación o la quimioterapia. En otro aspecto, los compuestos inhibidores de PI3K δ y los radioisótopos o agentes quimioterapéuticos pueden conjugarse con el mismo anticuerpo antitumoral.

25 [0136] Para el tratamiento de trastornos de resorción ósea o trastornos mediados por osteoclastos, los inhibidores de PI3K δ pueden administrarse mediante cualquier método adecuado. La administración focal puede ser deseable, como por inyección intraarticular. En algunos casos, puede ser deseable acoplar los compuestos a un resto que pueda dirigir los compuestos al hueso. Por ejemplo, un inhibidor de PI3K δ se puede acoplar a compuestos con alta afinidad por la hidroxiapatita, que es un componente principal del hueso. Esto se puede lograr, por ejemplo, adaptando un método de acoplamiento de tetraciclina desarrollado para la administración dirigida de estrógenos al hueso (Orme et al., *Bioorg Med Chem Lett*, 4 (11): 1375-80 (1994)).

35 [0137] Para ser eficaz terapéuticamente en la modulación de objetivos del sistema nervioso central, los agentes utilizados en los métodos de la invención deben penetrar fácilmente en la barrera hematoencefálica cuando se administran periféricamente. Sin embargo, los compuestos que no pueden penetrar en la barrera hematoencefálica se pueden administrar de manera efectiva por vía intravenosa.

40 [0138] Como se señaló anteriormente, las características del propio agente y la formulación del agente pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo* del agente administrado. Dicha información farmacocinética y farmacodinámica se puede recopilar a través de estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo*, que luego se confirman en humanos durante el curso de ensayos clínicos. Por lo tanto, para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, una dosis terapéuticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos bioquímicos y/o basados en células. Luego, la dosificación se puede formular en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante deseable que modula la expresión o actividad de PI3K δ . A medida que se realicen estudios en humanos, surgirá más información sobre los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y afecciones.

50 [0139] La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el "índice terapéutico", que normalmente se expresa como la relación LD₅₀/ED₅₀. Se prefieren los compuestos que exhiben índices terapéuticos grandes, es decir, la dosis tóxica es sustancialmente más alta que la dosis efectiva. Los datos obtenidos de tales ensayos de cultivo celular y estudios adicionales en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para uso humano. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad.

60 [0140] Para los métodos de la invención, se puede usar cualquier régimen de administración eficaz que regule el momento y la secuencia de dosis. Las dosis del agente incluyen preferiblemente unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad efectiva del agente. Como se usa en el presente documento, "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para modular la expresión o actividad de PI3K δ y/o derivar un cambio medible en un parámetro fisiológico del sujeto mediante la administración de una o más de las unidades de dosificación farmacéutica.

65 [0141] Los niveles de dosificación ejemplares para un sujeto humano son del orden de aproximadamente 0,001 miligramos de agente activo por kilogramo de peso corporal (mg/kg) a aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, las unidades de dosificación del agente activo comprenden de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 10.000 mg, preferiblemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1.000 mg, dependiendo de la indicación, vía de

administración, etc. Dependiendo de la vía de administración, una dosis adecuada puede calcularse de acuerdo con el peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño del órgano. El médico tratante determinará el régimen de dosificación final en vista de una buena práctica médica, considerando varios factores que modifican la acción de los medicamentos, por ejemplo, la actividad específica del agente, la identidad y la gravedad del estado de la enfermedad, la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, y la gravedad de cualquier infección. Entre los factores adicionales que se pueden tener en cuenta se incluyen el tiempo y la frecuencia de la administración, las combinaciones de medicamentos, las sensibilidades a la reacción y la tolerancia/respuesta al tratamiento. El perfeccionamiento adicional de la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cualquiera de las formulaciones mencionadas en este documento se realiza de manera rutinaria por el profesional experto sin experimentación excesiva, especialmente a la luz de la información de dosificación y los ensayos divulgados, así como los datos farmacocinéticos observados en ensayos clínicos en humanos. Se pueden determinar las dosis apropiadas mediante el uso de ensayos establecidos para determinar la concentración del agente en un fluido corporal u otra muestra junto con datos de respuesta a la dosis.

[0142] La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos del agente y la vía de administración. La dosificación y la administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del resto activo o para mantener el efecto deseado. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en una dosis única, dosis discretas múltiples, infusión continua, depósitos de liberación sostenida o combinaciones de los mismos, según sea necesario para mantener el nivel mínimo deseado del agente. Las composiciones farmacéuticas de acción corta (es decir, vida media corta) se pueden administrar una vez al día o más de una vez al día (por ejemplo, dos, tres o cuatro veces al día). Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana o una vez cada dos semanas. Las bombas, como las bombas subcutáneas, intraperitoneales o subdurales, pueden preferirse para la infusión continua.

[0143] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ayudar adicionalmente a comprender la invención, y presuponen una comprensión de los métodos convencionales bien conocidos por aquellas personas que tienen una experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenecen los ejemplos, por ejemplo, la construcción de vectores y plásmidos, la inserción de genes que codifican polipéptidos en dichos vectores y plásmidos, o la introducción de vectores y plásmidos en células huésped. Dichos métodos se describen en detalle en numerosas publicaciones que incluyen, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), Ausubel et al. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994); y Ausubel et al. (Eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., John Wiley & Sons, Inc. (1999). Los materiales y condiciones particulares descritas a continuación tienen el propósito de ejemplificar aspectos particulares de la invención y no deben interpretarse para limitar el alcance razonable de la misma.

EJEMPLO 1

Preparación y purificación de PI3K α , β y δ recombinante

[0144] Los complejos heterodiméricos PI3K recombinantes que consisten en una subunidad catalítica p110 y una subunidad reguladora p85 se sobreexpresaron usando el sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC® HT (GIBCO/-BRL), y luego se purificaron para su uso en ensayos bioquímicos. Las cuatro quinasas PI 3 de clase I se clonaron en vectores de baculovirus de la siguiente manera:

p110 δ : se subclonó una versión etiquetada con FLAG® de p110 δ humano (SEQ ID NO: 1) (véase Chantry et al., *J Biol Chem*, 272: 19236-41 (1997)) usando técnicas estándar de ADN recombinante en *Bam*H1-Xba1 sitio del vector de expresión de células de insecto pFastbac HTb (Life Technologies, Gaithersburg, MD), de modo que el clon estaba en el marco con la etiqueta His del vector. El sistema FLAG® se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4,703,004; 4,782,137; 4,851,341; y 5,011,912, y los reactivos están disponibles de Eastman Kodak Co.

p110 α : Similar al método usado para p110 δ , descrito anteriormente, una versión etiquetada con FLAG® de p110 α (ver Volinia et al., *Genomics*, 24 (3): 427-477 (1994)) se subclonó en sitios *Bam*H1-HindIII de pFastbac HTb (Life Technologies) de modo que el clon estaba en el marco con la etiqueta His del vector.

p110 β : se amplificó un clon p110 β (ver Hu et al., *Mol Cell Biol*, 13: 7677-88 (1993)) de la biblioteca de ADNc de bazo MARATHON® Ready humano (Clontech, Palo Alto CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando los siguientes cebadores:

Cebador 5'

5'-
GATCGAATTCGGCGCCACCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGTGCTTCAGTTT
CATAATGCCTCC-3' (SEQ ID NO: 3)

Cebador 3'

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

El cebador 5' se construyó para contener una etiqueta FLAG® en marco con la secuencia p110β. Después de la amplificación, la secuencia FLAG®-p110β se subclonó utilizando técnicas recombinantes estándar en los sitios *EcoR1-Not1* de pFastbac HTa (Life Technologies), de modo que el clon estaba en el marco con la etiqueta His del vector.

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

Cebador 5'

10 5'-AGAATGCGGCCGCATGGAGCTGGAGAACTATAAACAGCCC-3' (SEQ ID NO: 5)

Cebador 3'

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

15 Posteriormente se unió una etiqueta FLAG® al extremo 5' de la secuencia p110γ y se clonó en los sitios *BamH1-Spe1* de pFastbac HTb (Life Technologies) utilizando técnicas estándar de ADN recombinante, con la secuencia FLAG®-110γ en marco con la etiqueta His del vector.

p85α: se subclonó un fragmento *BamH1-EcoR1* del ADNc de p85 marcado con FLAG® (véase Skolnik et al., Cell, 65: 83-89 (1991)) en los sitios *BamH1-EcoR1* del vector pFastbac dual (Life Technologies).

20 **[0145]** Los baculovirus recombinantes que contienen los clones anteriores se generaron usando el protocolo recomendado por el fabricante (Life Technologies). Los baculovirus que expresan la subunidad catalítica p110α, p110β o p110δ marcada con His y la subunidad p85 se coinfectaron en células de insecto Sf21. Para enriquecer el complejo enzimático heterodimérico, se infectó una cantidad excesiva de baculovirus que expresa la subunidad p85, y la subunidad catalítica p110 etiquetada con His complejada con p85 se purificó en una columna de afinidad de níquel. Dado que p110γ no se asocia con p85, las células Sf21 se infectaron con baculovirus recombinantes que expresan p110γ marcado con His solamente. En un enfoque alternativo, p101 puede clonarse en baculovirus, para permitir la coexpresión con su pareja de unión preferida p110γ.

30 **[0146]** Las células Sf21 postinfectadas de 72 horas (3 litros) se cosecharon y homogeneizaron en un tampón hipotónico (HEPES-KOH 20mM, pH 7,8, KCl 5 mM, cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche Biochemicals, Indianápolis, IN), usando un homogeneizador de Dounce. Los homogeneizados se centrifugaron a 1.000 x g durante 15 minutos. Los sobrenadantes se centrifugaron adicionalmente a 10.000 x g durante 20 minutos, seguido de ultracentrifugación a 100.000 x g durante 60 minutos. La fracción soluble se cargó inmediatamente en 10 ml de columna de afinidad de níquel HITRAP® (Pharmacia, Piscataway, NJ) equilibrada con 50 ml de tampón A (HEPES-KOH 50 mM, pH 7,8, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM). La columna se lavó abundantemente con tampón A y se eluyó con un gradiente lineal de Imidazol 10-500 mM. La subunidad p85 libre se eliminó de la columna durante el paso de lavado y solo el complejo enzimático heterodimérico eluyó a imidazol 250 mM. Las alícuotas de las fracciones de níquel se analizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE), manchado con SYPRO Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), y se cuantificó con STORM® PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Las fracciones activas se agruparon y se cargaron directamente en una columna de heparina Hi-trap de 5 ml preequilibrada con tampón B que contenía HEPES-KOH 50 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, ditiotreitól (DTT) 2 mM. La columna se lavó con 50 ml de tampón B y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,05-2 M. Un único pico que contiene el complejo enzimático PI3K eluyó a NaCl 0,8 M. El análisis de gel de SDS-poliacrilamida mostró que las fracciones enzimáticas de PI3K purificadas contenían un complejo estequiométrico 1:1 de las subunidades p110 y p85. El perfil proteico del complejo enzimático durante la cromatografía de heparina correspondió al de la actividad de la quinasa de lípidos. Las fracciones activas se agruparon y congelaron bajo nitrógeno líquido.

EJEMPLO 2

50 **Cribado de alto rendimiento PI3Kδ (HTS) y ensayo de selectividad**

[0147] Se realizó un cribado de alto rendimiento de una biblioteca química patentada para identificar inhibidores candidatos de la actividad PI3Kδ. PI3Kδ cataliza un fosfotransferido de γ-[³²P] ATP a liposomas PIP₂/PS en la posición D3' del anillo de inositol lipídico PIP₂. Esta reacción depende de MgCl₂ y se apaga en tampón de fosfato de potasio de alta molaridad pH 8,0 que contiene EDTA 30 mM. En la pantalla, esta reacción se realiza en presencia o ausencia de compuestos de biblioteca. Los productos de reacción (y todos los productos no etiquetados) se transfieren a una placa de filtro de PVDF prehumedecida de 96 pocillos, se filtran y se lavan con fosfato de potasio de alta molaridad. Se agrega centelleante a los pocillos secos y se cuantifica la radiactividad incorporada.

60 **[0148]** La mayoría de las operaciones de ensayo se realizaron usando estaciones de trabajo robóticas BIOMEK® 1000 (Beckman) y todas las placas se leyeron usando protocolos de contador de placa de centelleo líquido Wallac.

[0149] Las reservas de ensayo 3X de sustrato y enzima se elaboraron y almacenaron en una fosa (para ensayos de robótica) o en una placa de polipropileno con fondo en V de 96 pocillos (para ensayos manuales). Los reactivos fueron estables durante al menos 3 horas a temperatura ambiente.

[0150] El sustrato 3X para el HTS contenía Na₂ATP 0,6 mM, 0,10 mCi/mL γ -[³²P]ATP (NEN, Pittsburgh, PA), liposomas PIP₂/PS 6 μ M (Avanti Polar Lipids, Inc., Atlanta, GA), en 20 HEPES mM, pH 7,4.

5 **[0151]** El stock de enzimas 3X para el HTS contenía PI3K δ 1,8 nM, IgG de caballo 150 μ g/ml (usado solo como estabilizador), MgCl₂ 15 mM, DTT 3 mM en HEPES 20 mM, pH 7,4.

10 **[0152]** Las muestras de la biblioteca de cribado químico de alto rendimiento (HTS) (cada una con un conjunto de 22 compuestos) en dimetilo sulfóxido (DMSO) se diluyeron a 18,75 μ M o 37,8 μ M en agua doblemente destilada, y se colocaron 20 μ L de las diluciones en los pocillos de una placa de polipropileno de 96 pocillos para análisis. El control inhibidor negativo (o control enzimático positivo) se diluyó con DMSO en agua, y los controles inhibidores positivos emplearon concentraciones de LY294002 suficientes para proporcionar una inhibición del 50% y 100%.

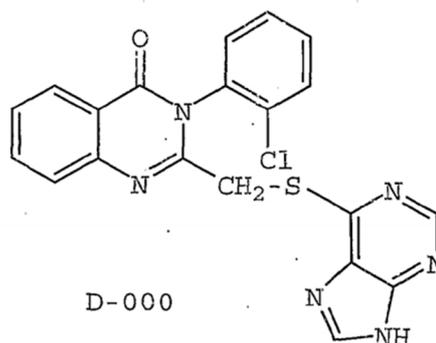
15 **[0153]** A las diluciones de la biblioteca química agrupada de 20 μ L, se añadieron 20 μ L de sustrato 3X. La reacción se inició con 20 μ L de enzima 3X, incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esta dilución estableció una concentración final de 200 μ M de ATP en el volumen de reacción. La reacción se detuvo con 150 μ L de tampón de enfriamiento rápido (fosfato de potasio 1,0 M pH 8,0, EDTA 30 mM). Luego se transfirió una porción de la solución enfriada (180 μ L) a una placa de filtro de PVDF (Millipore #MAIP NOB humedecido previamente con lavados secuenciales de 200 μ L de metanol al 100%, agua y finalmente tampón de lavado de fosfato de potasio 1,0 M pH 8,0).

20 **[0154]** La placa de filtro de PVDF se aspiró a vacío moderado (2-5 mm Hg), se lavó con 5 x 200 μ L de tampón de lavado, y luego se secó por aspiración. El filtro se secó posteriormente, se dejó secar al aire por completo y se insertó en un casete de conteo Wallac con 50 μ L de cóctel de centelleo Ecoscint añadido por pocillo. La radioactividad incorporada se cuantificó y los datos se analizaron, después de normalizar al control positivo de la enzima (establecido al 100%), para identificar la intersección de la curva al valor de inhibición del 50% para estimar los valores de CI₅₀ para los inhibidores.

25 **[0155]** Se seleccionó un total de 57 pozos maestros agrupados para la desconvolución, en base a criterios combinados de <42% de actividad residual a la concentración probada, y una tasa de aciertos total aceptada de no más de 0,2%. A 22 compuestos por pocillo, se identificó un total de 1254 compuestos a través de esta desconvolución y se ensayaron individualmente a la concentración 1X de 27,7 μ M para identificar qué compuestos exhibían la actividad deseada. A partir de estos ensayos, se seleccionaron 73 compuestos y se analizaron adicionalmente para desarrollar las curvas CI₅₀. De los resultados de la curva CI₅₀, se seleccionaron 34 compuestos para ensayos de selectividad contra PI3K α y PI3K β (véase el protocolo de ensayo en el Ejemplo 11).

30 **[0156]** A partir de los ensayos de selectividad, se seleccionó un compuesto, 3-(2-clorofenilo)-2-(9H-purina-6-ilsulfanilmetilo)-3H-quinazolina-4-ona (Compuesto D-000) como compuesto relativamente potente y selectivo. Las búsquedas en el catálogo y los ensayos de selectividad de muchos compuestos análogos de los golpes potentes y/o selectivos arrojaron solo un compuesto que era un análogo activo y selectivo de D-000. Este compuesto se adquirió de Contract Services Corporation (Catálogo n° 7232154) y difirió de D-000 en la sustitución de un grupo fenilo por el grupo 2-clorofenilo de D-000.

45



55

60 **[0157]** Como se describió anteriormente, el inhibidor de PI 3-quinasa LY294002 (Calbiochem, La Jolla, CA) no tiene una selectividad significativa entre las diferentes isoformas de PI 3-quinasa probadas. Bajo nuestras condiciones de ensayo, LY294002 inhibió las tres isoformas de PI 3-quinasa con una CI₅₀ de 0,3 a 1 μ M. Sin embargo, cuando el compuesto D-000 se probó frente a las mismas isoformas de PI 3-quinasa, se observó una selectividad distinta. Específicamente, como se muestra en la Figura 1, D-000 inhibió la actividad de la isoforma δ de PI3K con una CI₅₀ de aproximadamente 0,3 μ M, mientras que en condiciones similares no inhibió las actividades de las isoformas α y β en un límite de compuesto 100 μ M. Estos resultados muestran que D-000 inhibe selectivamente la actividad de PI3K δ .

65

EJEMPLOS 3-7

[0158] Dado que PI3K δ se expresa a niveles significativos solo en leucocitos, es importante estudiar los efectos del inhibidor selectivo de PI3K δ sobre las funciones de los leucocitos. En consecuencia, se examinaron los efectos de la inhibición de PI3K δ en varios tipos de leucocitos. Se examinaron los neutrófilos para determinar los efectos que podría provocar la inhibición selectiva de PI3K δ (Ejemplo 3, a continuación). Sorprendentemente, se encontró que la inhibición selectiva de la actividad de PI3K δ parece estar significativamente asociada con la inhibición de algunas, pero no todas las funciones características de los neutrófilos activados. Además, también se probaron los efectos de la inhibición de PI3K δ sobre la función de células B y células T (Ejemplos 4-5, más adelante). Además, como PI3K δ también se expresa en osteoclastos, se estudió el efecto de la inhibición de PI3K δ sobre la función de estas células especializadas (Ejemplo 6, a continuación).

EJEMPLO 3

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

[0159] Se probaron los efectos de un inhibidor de PI3K δ de la invención, es decir, D-000, sobre funciones de neutrófilos tales como generación de superóxido, exocitosis de elastasa, quimiotaxis y destrucción bacteriana.

A. Preparación de neutrófilos a partir de sangre humana

[0160] Alícuotas (8 ml) de sangre heparinizada de voluntarios sanos se colocaron en capas sobre cojines de 3 ml de 7,3% FICOLL® (Sigma, St. Louis, MO) y 15,4% de HYPaque® (Sigma) y se centrifugaron a 900 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga de mesa (Beckman). La banda rica en neutrófilos justo encima del cojín FICOLL®-HYPaque® se recogió y se lavó con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) que contenía gelatina al 0,1%. Los eritrocitos residuales se eliminaron por lisis hipotónica con NaCl al 0,2%. La preparación de neutrófilos se lavó dos veces con HBSS que contenía gelatina al 0,1% y se usó inmediatamente.

B. Medición de la producción de superóxido a partir de neutrófilos.

[0161] La generación de superóxido es una de las características de la activación de neutrófilos. Una variedad de activadores potencian la generación de superóxido por neutrófilos. Se midió el efecto del inhibidor de PI3K δ D-000 sobre la generación de superóxido por tres agonistas diferentes: TNF1 α , IgG y fMLP, cada uno representando clases separadas de activador. El superóxido generado por los neutrófilos se midió monitoreando el cambio en la absorbancia tras la reducción del citocromo C mediante la modificación del método descrito por Green et al., (Págs. 14,5,1-14,5,11 en la Supp. 12, Curr Protocols Immunol (Eds., Colligan et al.) (1994)), como sigue. Los pocillos individuales de una placa de 96 pocillos se revistieron durante la noche a 4°C con 50 μ L de solución de 2 mg/ml de fibrinógeno humano o IgG. Los pocillos se lavaron con PBS y se agregaron los siguientes reactivos a cada pocillo: 50 μ L de HBSS o superóxido dismutasa (1 mg/ml), 50 μ L de HBSS o TNF1 α (50 ng/ml), 50 μ L de citocromo C (2,7 mg/ml) y 100 μ L de suspensión purificada de neutrófilos humanos (2 x 10⁶ células/ml). La placa se centrifugó durante 2 minutos a 200 rpm y la absorbancia a 550 nm se controló durante 2 horas. Para medir las cantidades relativas de superóxido generadas, los valores obtenidos de los pocillos que contienen superóxido dismutasa se restaron de todos y se normalizaron a los valores obtenidos de los pocillos sin ningún inhibidor.

[0162] Como se muestra en la Figura 2, el inhibidor de PI3K δ D-000 inhibe la generación de superóxido inducida por TNF por neutrófilos de una manera dependiente de la concentración. La generación de superóxido inducida por TNF se redujo a su valor medio máximo a aproximadamente 3 μ M de D-000. La Figura 2 también revela que la generación de superóxido inducida por IgG no fue inhibida significativamente por D-000. De hecho, incluso a 10 μ M, este inhibidor de PI3K δ no tuvo ningún efecto sobre la generación de superóxido inducida por IgG.

[0163] A continuación, se estudió el efecto de D-000 sobre la generación de superóxido inducida por otro inductor potente, el péptido bacteriano, formilada-Met-Leu-Phe (fMLP). Al igual que la generación de superóxido inducida por TNF, la generación de superóxido inducida por fMLP también fue inhibida por D-000 (Figura 3). Estos resultados muestran que el inhibidor de PI3K δ D-000 puede prevenir la inducción específica de estímulo de la generación de superóxido por neutrófilos, lo que indica que PI3K δ está involucrado en este proceso.

C. Medición de la exocitosis de elastasa de neutrófilos

[0164] Además de la generación de superóxidos, los neutrófilos activados también responden liberando varias proteasas que son responsables de la destrucción de los tejidos y el cartílago durante la inflamación. Como indicación de la liberación de proteasa, se midió el efecto de D-000 sobre la exocitosis de elastasa. La exocitosis de elastasa se cuantificó mediante modificación del procedimiento descrito por Ossanna et al. (J Clin Invest, 77: 1939-1951 (1986)), como sigue. Los neutrófilos humanos purificados (0,2 x 10⁶) (tratados con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO) fueron estimulados con fMLP en PBS que contenía 0,01 mg/mL de citocalasina B, azida de sodio 1,0 μ M (NaN₃), 5 μ g/mL L-metionina y fMLP 1 μ M durante 90 minutos a 37°C en una placa de 96 pocillos. Al final del período de incubación, la placa se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm, y se transfirieron 90 μ L del sobrenadante a 10 μ L de solución 10 mM de un péptido sustrato de elastasa, MeO-suc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA, en donde MeO-suc = metoxi-

succinilo; pNA = p-nitroanilida (Calbiochem, San Diego, CA). La absorbancia a 410 nm se controló durante 2 horas en un lector de placas de 96 pocillos. Para medir las cantidades relativas de elastasa excitada, todos los valores de absorbancia se normalizaron a los valores sin ningún inhibidor. Como se muestra en la Figura 4, el inhibidor de PI3K δ D-000 inhibe la exocitosis de elastasa inducida por fMLP significativamente, y lo hace de una manera dependiente de la dosis. La inhibición fue la mitad del máximo a una concentración de aproximadamente 2-3 μ M de D-000.

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

[0165] Los neutrófilos tienen la capacidad intrínseca de migrar a través de los tejidos, y son uno de los primeros tipos de células en llegar a los sitios de inflamación o lesión tisular. Se midió el efecto de D-000 sobre la migración de neutrófilos hacia un gradiente de concentración de fMLP. El día antes de que se realizaran los ensayos de migración, las placas de 6 pocillos se recubrieron con proteína de fusión ICAM-1/Fc recombinante (Van der Vieren et al., *Immunity*, 3: 683-690 (1995)) (25 μ g/ml en bicarbonato tampón, pH 9,3) y se dejó durante la noche a 4°C. Después del lavado, se añadió solución de agarosa al 1%, en RPMI-1640 con albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA), a los pocillos con o sin un inhibidor, y las placas se colocaron en un refrigerador antes de perforar agujeros en la agarosa gelificada para crear placas (1 agujero central rodeado de 6 periféricos por pozo).

[0166] Se obtuvieron neutrófilos humanos como se describe anteriormente, y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 0,5% de BSA a 5×10^6 células/ml. Después de combinar volúmenes iguales de suspensión y medio de neutrófilos (ya sea con DMSO o una dilución en serie del compuesto de prueba en DMSO), los neutrófilos se dividieron en alícuotas en los agujeros periféricos, mientras que el agujero central recibió fMLP (5 μ M). Las placas se incubaron a 37°C en presencia de CO₂ al 5% durante 4 h, seguido de la terminación de la migración mediante la adición de solución de glutaraldehído al 1% en D-PBS. Después de eliminar la capa de agarosa, los pocillos se lavaron con agua destilada y se secaron.

[0167] El análisis de la migración de neutrófilos se realizó en una estación de trabajo de video Nikon DIAPHOT® con microscopio invertido (1x objetivo) utilizando el programa NIH 1,61. Usando los programas Microsoft Excel y Table Curve 4 (SSPS Inc., Chicago ILO), se obtuvo un índice de migración para cada una de las condiciones estudiadas. El índice de migración se definió como el área bajo una curva que representa el número de neutrófilos migrados versus la distancia neta de migración por célula.

[0168] Como se muestra en la Figura 5, el inhibidor de PI3K δ D-000 tuvo un profundo efecto sobre la migración de neutrófilos, inhibiendo esta actividad de una manera dependiente de la dosis. La CE₅₀ de este compuesto para la inhibición de la migración de neutrófilos en este ensayo es de aproximadamente 1 μ M. Basado en una inspección visual de las rutas registradas de las células en este ensayo, parece que la longitud total de la ruta para los neutrófilos no se vio afectada significativamente por el compuesto de prueba. Más bien, el compuesto afectó la orientación o sentido de dirección de los neutrófilos, de modo que en lugar de migrar a lo largo del eje del gradiente quimioatrayente, las células migraron de manera no dirigida o menos dirigida.

E. Medición de la capacidad bactericida de los neutrófilos

[0169] Dado que el inhibidor de PI3K δ D-000 afecta ciertas funciones de neutrófilos detalladas anteriormente, fue interesante ver si el compuesto afecta la destrucción bacteriana mediada por neutrófilos. El efecto de D-000 sobre la muerte de *Staphylococcus aureus* mediada por neutrófilos se estudió de acuerdo con el método descrito por Clark y Nauseef (pp. 7,23,4-7,23,6 en Vol. 2, Supp. 6, *Curr Protocols Immunol* (Eds., Colligan et al. (1994))). Los neutrófilos humanos purificados (5×10^6 células/ml) (tratados con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO) se mezclaron con suero autólogo. Las células de *S. aureus* cultivadas durante la noche se lavaron, se resuspendieron en HBSS y se añadieron a los neutrófilos opsonizados en suero en una proporción de 10:1. A los neutrófilos se les permitió internalizar las bacterias mediante fagocitosis mediante incubación a 37°C durante 20 min. Las bacterias no internalizadas fueron destruidas por 10 unidades/ml de lisostafina a 37°C durante 5 minutos y la mezcla total se rotó a 37°C. Las muestras se extrajeron en diversos momentos durante hasta 90 minutos y los neutrófilos se lisaron por dilución en agua. Las bacterias viables se contaron colocando diluciones apropiadas en una placa de tripticasa-soja-agar y contando las colonias de *S. aureus* después del crecimiento durante la noche.

[0170] Como se muestra en la Figura 6, la muerte mediada por neutrófilos de *S. aureus* fue similar en muestras tratadas con DMSO (control) y con D-000. Estos resultados indican que el inhibidor de PI3K δ no afecta significativamente la capacidad de los neutrófilos para matar a *S. aureus*, lo que sugiere que PI3K δ no está involucrado en esta vía de la función de neutrófilos.

EJEMPLO 4

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

[0171] También se estudiaron los efectos del inhibidor de la PI 3-quinasa en las funciones de las células B, incluidos los índices clásicos, como la producción de anticuerpos y la proliferación inducida por estímulos específicos.

A. Preparación y simulación de células B de sangre periférica humana

[0172] La sangre heparinizada (200 ml) de voluntarios sanos se mezcló con un volumen igual de D-PBS, se estratificó en 10 x 10 ml de FICOLL-PAQUE® (Pharmacia) y se centrifugó a 1600 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfaz FICOLL®/suero, se superpusieron sobre 10 ml de suero fetal bovino (FBS) y se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos para eliminar las plaquetas. Después del lavado, las células se incubaron con DYNAL® Antibody Mix (kit de células B) (Dynal Corp., Lake Success, NY) durante 20 minutos a 4-8°C. Después de la eliminación del anticuerpo no unido, los PEL se mezclaron con perlas magnéticas recubiertas con IgG anti-ratón (Dynal) durante 20 minutos a 4-8°C con agitación suave seguido de la eliminación de células marcadas no B en el separador de perlas magnéticas. Este procedimiento se repitió una vez más. Las células B se resuspendieron en RPMI-1640 con FBS al 10% y se mantuvieron en hielo hasta su uso posterior.

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

[0173] Para estudiar la producción de anticuerpos, se dividieron en alícuotas de células B a 50-75 x 10³ células/pocillo en una placa de 96 pocillos con o sin inhibidor, a las que se les asignaron células *Staphylococcus aureus* ILO-2 (100 U/mL) y PANSORBIN® (Calbiochem) (1:90.000) fueron añadidos. Parte de los medios se eliminó después de 24-36 h, y se agregaron medios nuevos (con o sin inhibidor) e ILO-2. Los cultivos se incubaron a 37°C, en presencia de una incubadora de CO₂ durante 7 días adicionales. Se extrajeron muestras de cada condición (por triplicado) y se analizaron para determinar IgG e IgM, según se midió mediante ELISA. Brevemente, las 4 placas IMMULON® de 96 pocillos se revistieron (50 µL/pocillo) con IgG antihumana de burro de 150 ng/ml (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove PA), o IgG + IgM antihumana de burro de 2 µg/ml (H+L) (Jackson ImmunoResearch) en tampón de bicarbonato, y se dejó durante la noche a 4°C. Después de lavar 3 veces con solución salina tamponada con fosfato que contiene 0,1% TWEEN®-80 (PBST) (350 µL/pocillo) y bloquear con suero de cabra al 3% en PBST (100 µL/pocillo) durante 1 hora a temperatura ambiente, muestras (100 µL/pocillo) del medio gastado de células B diluido en PBST. Para las placas de IgG, el rango de dilución fue de 1:500 a 1:10.000, y para IgM de 1,50 a 1:1000. Después de 1 hora, las placas se expusieron a IgG antihumana conjugada con biotina (100 ng/ml) o IgM antihumana (200 ng/ml) (Jackson ImmunoResearch) durante 30 minutos, seguido de estreptavidina-HRP (1:20.000) durante 30 minutos, y finalmente, a una solución TMB (1:100) con H₂O₂ (1:10.000) durante 5 minutos, con 3 x PBST lavado entre etapas. El desarrollo del color se detuvo con una solución de H₂SO₄, y las placas se leyeron en un lector de placas ELISA.

[0174] Como se muestra en la Figura 7, D-000 inhibió significativamente la producción de anticuerpos. La producción de IgM se vio afectada más que la producción de IgG: se observó una inhibición semimáxima de la producción de IgM a aproximadamente 1 µM, frente a aproximadamente 7 µM para una inhibición comparable de la producción de IgG.

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

[0175] En el experimento anterior, las células B fueron estimuladas usando PANSORBIN®. También se midió el efecto de D-000 sobre la respuesta de proliferación de células B cuando se estimularon a través de su IgM de la superficie celular usando anticuerpo anti-IgM. Los esplenocitos murinos (Balb/c) se sembraron en placas de microtitulación de 96 pocillos a 2 x 10⁵ células por pocillo en FBS/RPMI al 10%. Las diluciones apropiadas del inhibidor de prueba en medio completo se agregaron a las células y las placas se incubaron durante 30-60 minutos antes de la adición del estímulo. Después de la preincubación con el inhibidor de prueba, se añadió a los pocillos una preparación F(ab')₂ de anticuerpo de cabra específico para la cadena µ de IgM de ratón a una concentración final de 25 µg/ml. Las placas se incubaron a 37°C durante 3 días y se añadió 1 µCi de [³H]-timidina a cada pocillo durante las últimas cuatro horas de cultivo. Las placas se cosecharon en filtros de fibra lavados y la incorporación de radiomarcaje se determinó usando un contador beta (Matrix 96, Packard Instrument Co., Downers Grove, IL) y se expresó como recuentos por minuto (CPM).

[0176] La Figura 8 muestra el efecto de D-000 sobre la proliferación de células B estimulada por anti-IgM. El compuesto inhibió la proliferación de células B estimulada por anti-IgM de una manera dependiente de la dosis. A aproximadamente 1 µM, la proliferación se redujo a su valor medio máximo.

[0177] Debido a que el compuesto D-000 inhibe la proliferación de células B, se prevé que este compuesto y otros inhibidores de PI3Kδ puedan usarse para suprimir la proliferación indeseable de células B en entornos clínicos. Por ejemplo, en los tumores malignos de células B, las células B de diversas etapas de diferenciación muestran una proliferación no regulada. En base a los resultados mostrados anteriormente, se puede inferir que los inhibidores selectivos de PI3Kδ podrían usarse para controlar, limitar o inhibir el crecimiento de tales células.

EJEMPLO 5**Caracterización del papel de PI3Kδ en la función de linfocitos T**

[0178] Se midió la proliferación de células T en respuesta a la coestimulación de CD₃ + CD28. Las células T se purificaron de sangre humana sana mediante selección negativa usando perlas magnéticas recubiertas con anticuerpo

de acuerdo con el protocolo del fabricante (Dynal) y se resuspendieron en RPMI. Las células se trataron con DMSO o una dilución en serie de D-000 en DMSO y se colocaron en placas a 1×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos prerrecubierta con IgG antimouso de cabra. Los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD3 y anti-CD28 se añadieron a cada pocillo a 0,2 ng/ml y 0,2 µg/ml, respectivamente. La placa se incubó a 37°C durante 24 horas y se añadió $[^3\text{H}]$ -timidina (1 µCi/pocillo). Después de otras 18 horas de incubación, las células se cosecharon con un recolector automático de células, se lavaron y se cuantificó la radiactividad incorporada.

[0179] Aunque el inhibidor de PI3Kδ D-000 inhibió la proliferación de células T inducida por anti-CD3 y anti-CD28, su efecto no es tan fuerte como su efecto en las células B o en algunas de las funciones de los neutrófilos. La inhibición semimáxima de la incorporación de timidina no se logró a la concentración más alta probada, es decir, D-000 10 µM.

EJEMPLO 6

Caracterización del papel de PI3Kδ en la función de osteoclastos

[0180] Para analizar el efecto del inhibidor de PI3Kδ D-000 sobre los osteoclastos, se aislaron células de médula ósea de ratón y se diferenciaron en osteoclastos tratando las células con factor estimulante de colonias de macrófagos-1 (mCSF-1) y ligando de osteoprotegerina (OPGL) en suero que contiene medio (αMEM con 10% de FBS inactivado por calor; Sigma) durante 3 días. El día cuatro, cuando se desarrollaron los osteoclastos, se retiró el medio y se recolectaron las células. Los osteoclastos se colocaron en placas en rodajas de dentina a 10^5 células/pocillo en medio de crecimiento, es decir, αMEM que contenía 1% de suero y 2% de BSA con 55 µg/ml de OPGL y 10 ng/ml de mCSF-1. Después de 3 h, el medio se cambió a suero al 1% y BSA al 1%, con o sin osteopontina (25 µg/ml) y los inhibidores de PI3K (100 nM). El medio se cambió cada 24 horas con osteopontina fresca y los inhibidores. A las 72 h, se retiró el medio y se lavaron las superficies de dentina con agua para eliminar los restos celulares y se tiñeron con hematoxilina ácida. El exceso de tinción se lavó y las profundidades de los pozos se cuantificaron usando microscopía confocal.

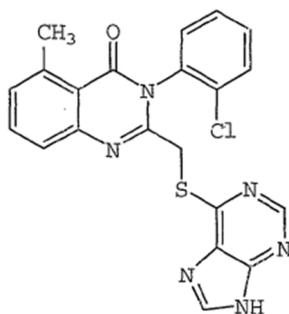
[0181] Como se muestra en la Tabla 1, en dos experimentos, los inhibidores de la PI 3-quinasa tuvieron un efecto inhibitorio sobre la función de los osteoclastos. Tanto los inhibidores inespecíficos LY294002 como la wortmannina inhibieron la actividad osteoclástica. Sin embargo, el inhibidor de PI3Kδ D-000 tuvo el efecto más profundo, ya que a 100 nM este compuesto inhibió casi por completo la actividad osteoclástica.

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

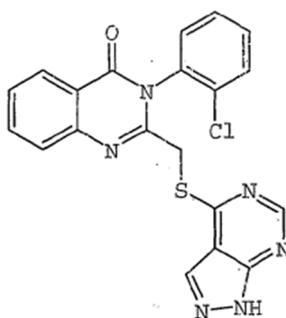
EJEMPLO 7

Caracterización del papel de PI3Kδ en la función basófila

[0182] La evaluación del efecto de un compuesto de la invención sobre la función basófila se probó usando un ensayo de liberación de histamina convencional, generalmente de acuerdo con el método descrito en Miura et al., J Immunol, 162: 4198-206 (1999). Brevemente, los basófilos enriquecidos se preincubaron con compuestos de prueba a varias concentraciones de 0,1 nM a 1.000 nM, durante 10 minutos a 37°C. Luego, se añadió IgE antihumana de cabra policlonal (0,1 µg/mL) o fMLP, y se dejó incubar durante 30 minutos adicionales. La histamina liberada en el sobrenadante se midió utilizando una técnica fluorométrica automatizada. Se probaron dos compuestos, que se muestran a continuación.



D-026



D-999

35 **[0183]** Se observó una disminución dependiente de la dosis en la liberación de histamina para 3-(2-clorofenilo)-5-
 metilo-2-(9H-purina-6-ilsulfanilmetilo)-3H-quinazolina-4-ona (D-026) cuando los basófilos fueron estimulados con anti-
 IgE. Esta supresión de la liberación de histamina fue esencialmente del 100% a 1.000 nM, con una CE₅₀ de
 aproximadamente 25 nM. Otro compuesto, 3-(2-clorofenilo)-2-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ilsulfanilmetilo)-3H-
 40 quinazolina-4-ona (D-999), en donde la estructura del anillo de purina se reorganizó, fue menos eficaz en la inhibición
 de la liberación de histamina. Ningún compuesto provocó ningún efecto cuando los basófilos fueron estimulados con
 fMLP. A modo de comparación, el inhibidor no selectivo de PI3K LY294002 se probó a 0,1 nM y 10.000 nM, mostrando
 una inhibición cercana al 100% de la liberación de histamina a la concentración más alta.

45 **[0184]** Estos datos indican que los inhibidores de la actividad delta de PI 3-quinasa pueden usarse para suprimir la
 liberación de histamina, que es uno de los mediadores de la alergia. Dado que la actividad de varias PI 3-quinasas es
 necesaria para el tráfico de proteínas, la secreción y la exocitosis en muchos tipos de células, los datos anteriores
 sugieren que la liberación de histamina por otras células, como los mastocitos, también puede ser interrumpida por
 inhibidores selectivos por PI 3-quinasa delta.

50 **EJEMPLOS DE SÍNTESIS QUÍMICA**

[0185] A continuación se proporcionan ejemplos específicos no limitantes de compuestos de la invención. Se entiende
 en la técnica que se pueden emplear grupos protectores cuando sea necesario de acuerdo con los principios generales
 de la química sintética. Estos grupos protectores se eliminan en las etapas finales de la síntesis en condiciones
 55 básicas, ácidas o hidrogenolíticas que son evidentes para los expertos en la materia. Al emplear la manipulación y
 protección apropiadas de cualquier funcionalidad química, la síntesis de compuestos de fórmula estructural (I) no
 establecida específicamente en este documento puede lograrse mediante métodos análogos a los esquemas
 establecidos a continuación.

60 **[0186]** A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales
 y se usaron sin purificación adicional. Todas las reacciones y las fracciones de cromatografía se analizaron por
 cromatografía de capa fina (TLC) en placas de gel de sílice de 250 mm, visualizadas con luz ultravioleta (UV) o tinción
 con yodo (I₂). Los productos e intermedios se purificaron por cromatografía flash o cromatografía líquida de alto
 65 rendimiento en fase inversa.

[0187] Las siguientes abreviaturas se usan en los ejemplos sintéticos: ac (acuoso), H₂O (agua), CHCl₃ (cloroformo),

HCl (ácido clorhídrico), MeOH (metanol), NaOH (hidróxido de sodio), NaOMe (metóxido de sodio), TFA (ácido trifluoroacético), K₂CO₃ (carbonato de potasio), SOCl₂ (cloruro de tionilo), CH₂Cl₂ (cloruro de metileno), EtOAc (acetato de etilo), DMF (dimetilformamida), EtOH (etanol), DMSO (dimetilsulfóxido), NaHCO₃ (bicarbonato de sodio), TLC (cromatografía en capa fina), HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), HOBT (hidroxibenzotriazol), EDC (etildietilaminopropilcarbodiimida), DIEA (diisopropiletilamina) y HOAc (ácido acético).

I. Procedimiento general

Procedimiento A

[0188] Se añadió cloruro de tionilo a una solución en agitación rápida de ácido antranílico o ácido benzoico en benceno, y la mezcla se agitó a reflujo durante 5 a 18 horas. La reacción se concentró al vacío y se separó dos veces con benceno. El aceite resultante se disolvió en CHCl₃ y a esa solución se le añadió la anilina apropiada. La mezcla de reacción se calentó a reflujo y se agitó hasta que se completó, según se determinó por TLC, momento en donde la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. El precipitado se eliminó por filtración, y el filtrado se concentró al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía y/o recristalización en MeOH para proporcionar las amidas 1a-1r.

Procedimiento B

[0189] A una suspensión en agitación rápida de una amida en ácido acético glacial se añadió cloruro de cloroacetilo. La mezcla de reacción se calentó a 120°C y se dejó agitar a esa temperatura hasta que se completa, según lo determinado por TLC. Después de un breve enfriamiento, la mezcla de reacción se concentró al vacío. El residuo crudo se purificó por extracción, cromatografía y/o recristalización para proporcionar los cloruros 2a-2r.

Procedimiento C

[0190] Se agitó una mezcla de un cloruro, un nitrógeno o un nucleófilo de azufre, por ejemplo, monohidrato de mercaptopurina o adenina, y K₂CO₃ en DMF a temperatura ambiente durante 15-72 horas. La suspensión resultante se vertió en agua y se mantuvo a 4°C durante varias horas. El sólido bruto se filtró, se lavó con agua y se purificó por cromatografía o recristalización para proporcionar los productos finales:

EJEMPLO 8

Preparación de compuestos intermedios: amidas

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

[0191] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 4,5-dimetoxiantranílico (5,0 g, 25,4 mmol) y SOCl₂ (5,5 ml, 76,1 mmol) en benceno (100 ml), seguido de 2-cloroanilina (6,7 ml, 63,5 mmol) y CHCl₃ (75 ml). El producto se lavó con NaHCO₃ acuoso (2 x 25 ml) y HCl (0,5 M, 75 ml) y se purificó por cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 4,3 g de una espuma marrón (55%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,42 (dd, *J* = 1,5, 8,3 Hz, 1H); 8,32 (br s, 1 H); 7,40 (dd, *J* = 1,4, 8,0 Hz, 1H); 7,31 (dt, *J* = 1,4, 7,9 Hz, 1H); 7,05 (dt, *J* = 1,5, 7,7 Hz, 1H); 7,03 (s, 1 H); 6,24 (s, 1 H); 3,88 (s, 3H); 3,87 (s, 3H). MS (ES): *m/z* 307,0 (M⁺).

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

[0192] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-5-bromobenzoico (5,0 g, 23,1 mmol) y SOCl₂ (7,0 ml, 95,9 mmol) en benceno (50 ml), seguido de 2-cloroanilina (7,3 ml, 69,3 mmol) y CHCl₃ (50 ml). El producto se purificó mediante dos cromatografías en CH₂Cl₂ para proporcionar 1,48 g de un sólido amarillo anaranjado (20%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,36 (dd, *J* = 1,2, 8,2 Hz, 1H); 8,20 (br s, 1 H); 7,62 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,42 (dd, *J* = 1,3, 8,0 Hz, 1H); 7,34 (dd, *J* = 2,2, 8,8 Hz, 1H); 7,28-7,33 (m, 1H); 7,09 (dt, *J* = 1,4, 7,7 Hz, 1H); 6,62 (d, *J* = 8,7 Hz, 1 H); 5,57 (br s, 2H).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-4-fluorobenzamida (1c)

[0193] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-4-fluorobenzoico (1,15 g, 7,41 mmol) y SOCl₂ (1,4 ml, 18,5 mmol) en benceno (25 ml), seguido de 2-cloroanilina (1,6 ml, 14,8 mmol) y CHCl₃ (25 ml). El producto se cromatografió en CH₂Cl₂, luego se trituró a partir de hexanos para proporcionar 1,02 g de un sólido blanquecino (52%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 12,91 (br s, 1H); 8,72 (dd, *J* = 2,7, 12 Hz, 1H); 8,34 (dd, *J* = 6,4, 9,2 Hz, 1H); 8,29 (dd, *J* = 5,9, 8,8 Hz, 1H); 7,81 (dd, *J* = 6,2, 8,8 Hz, 1H); 7,28 (dt, *J* = 2,4, 8,4 Hz, 1H); 7,21 (dd, *J* = 2,4, 9,0 Hz, 1H); 6,92 (ddd, *J* = 2,4, 7,3, 9,1 Hz, 1H); 6,54 (ddd, *J* = 2,4, 7,8, 8,8 Hz, 1H); 6,45 (dd, *J* = 2,4, 11 Hz, 1H); 5,93 (br s, 2H). MS (ES): *m/z* 265,0 (M⁺).

2-Amino-5-cloro-N-(2-clorofenilo)benzamida (1d)

[0194] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-5-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl_2 (2,2 mL, 29,2 mmol) en benceno (50 mL), seguido de 2-cloroanilina (2,5 mL, 23,3 mmol) y CHCl_3 (50 mL). El producto se purificó por recristalización en MeOH para proporcionar 1,72 g de un sólido amarillo oscuro (52%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,37 (dd, $J = 1,5, 8,3$ Hz, 1H); 8,22 (br s, 1H); 7,48 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H); 7,42 (dd, $J = 1,5, 8,1$ Hz, 1H); 7,31 (dt, $J = 1,4, 7,8$ Hz, 1H); 7,22 (dd, $J = 2,4, 8,8$ Hz, 1H); 7,09 (dt, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 6,67 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H); 5,56 (br s, 2H).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-6-fluorobenzamida (1e)

[0195] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-fluorobenzoico (2,0 g, 12,9 mmol) y SOCl_2 (2,3 mL, 32,2 mmol) en benceno (50 mL), seguido de 2-cloroanilina (2,7 mL, 25,8 mmol) y CHCl_3 (50 mL). El producto se purificó por cromatografía en EtOAc/hexanos para proporcionar 2,06 g de un sólido naranja pálido (60%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 9,00 (d, $J = 17$ Hz, 1H); 8,47 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,41 (d, $J = 8,0$ Hz, 1 H); 7,30 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,10-7,20 (m, 1H); 7,07 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 6,49 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 6,03 (br s, 2H). MS (ES): m/z 265,0 (M^+).

2-Amino-6-cloro-N-(2-clorofenilo)benzamida (1f)

[0196] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,5 g, 14,6 mmol) y SOCl_2 (2,7 mL, 36,4 mmol) en benceno (75 mL), seguido de 2-cloroanilina (3,1 mL, 29,1 mmol) y CHCl_3 (75 mL). El producto se cromatografió en CH_2Cl_2 para proporcionar 1,05 g de un sólido amarillo anaranjado (26%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,54 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 8,30 (br s, 1 H); 7,41 (dd, $J = 1,5, 8,0$ Hz, 1H); 7,33 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,10 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 7,09 (dt, $J = 1,6, 7,8$ Hz, 1H); 6,78 (dd, $J = 0,4, 7,9$ Hz, 1H); 6,63 (dd, $J = 0,9, 8,2$ Hz, 1H); 4,69 (br s, 2H). MS (ES): m/z 303,0 ($\text{M}+22$), 281,0 (M^+).

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

[0197] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-metilbenzoico (2,5 g, 16,5 mmol) y SOCl_2 (3,0 mL, 41,3 mmol) en benceno (75 mL), seguido de 2-cloroanilina (3,5 mL, 33,0 mmol) y CHCl_3 (75 mL). El producto se cromatografió en CH_2Cl_2 para proporcionar 2,19 g de un aceite marrón (51%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,58 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 7,99 (br s, 1H); 7,40 (dd, $J = 1,4, 8,0$ Hz, 1H); 7,34 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,11 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,09 (dt, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 6,64 (d, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 6,59 (d, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 4,29 (br s, 2H); 2,45 (s, 3H). MS (ES): m/z 283,0 ($\text{M}+22$).

2-Amino-3-cloro-N-(2-clorofenilo)benzamida (1h)

[0198] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-3-clorobenzoico (1,0 g, 5,82 mmol) y SOCl_2 (1,1 mL, 14,6 mmol) en benceno (25 mL), seguido de 2-cloroanilina (1,2 mL, 11,7 mmol) y CHCl_3 (25 mL). El producto se recristalizó en MeOH para proporcionar 1,29 g de un sólido amarillo (78%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,43 (dd, $J = 1,4, 8,3$ Hz, 1H); 8,30 (br s, 1 H); 7,47 (dd, $J = 1,1, 8,0$ Hz, 1H); 7,42 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 7,33 (dt, $J = 1,4, 7,9$ Hz, 1H); 7,09 (dt, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 6,68 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,13 (br s, 2H). MS (ES): m/z 281,0 (M^+).

2-Amino-N-bifenilo-2-ilo-6-clorobenzamida (1i)

[0199] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl_2 (2,1 mL, 29,3 mmol) en benceno (60 mL), seguido de 2-aminobifenilamina (4,15 g, 24,5 mmol) y CHCl_3 (60 mL). El producto se cromatografió en CH_2Cl_2 para proporcionar 2,16 g de un residuo espumoso de color ámbar oscuro (57%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,48 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H); 7,79 (br s, 1 H); 7,34-7,46 (m, 6H); 7,20-7,30 (m, 2H); 7,00 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 6,63 (dd, $J = 0,6, 7,9$ Hz, 1H); 6,54 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 4,58 (br s, 2H). MS (ES): m/z 323,1 (M^+).

2-Amino-6-cloro-N-otolilbenzamida (1j)

[0200] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (1,0 g, 5,83 mmol) y SOCl_2 (1,1 mL, 14,6 mmol) en benceno (30 mL), seguido de o-toluidina (1,4 mL, 12,8 mmol) y CHCl_3 (30 mL). El producto se cromatografió en CH_2Cl_2 para proporcionar 840 mg de un sólido amarillo aceitoso (55%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 7,96 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,60 (br s, 1 H); 7,23-7,30 (m, 2H); 7,14 (t, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 7,11 (t, $J = 8,3$ Hz, 1H); 6,78 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H); 6,64 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H); 4,73 (br s, 2H); 2,35 (s, 3H). MS (ES): m/z 261,0 (M^+).

2-Amino-6-cloro-N-(2-fluorofenilo)benzamida (1k)

[0201] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl_2 (2,1 mL, 29,1 mmol) en benceno (60 mL), seguido de 2-fluoroanilina (2,3 mL, 23,4 mmol) y CHCl_3 (60 mL). El producto se cromatografió en CH_2Cl_2 para proporcionar 1,05 g de un sólido amarillo (34%). ^1H RMN (CDCl_3) δ : 8,45 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H); 8,01 (br s, 1 H); 7,02-7,22 (m, 4H); 6,78 (dd, $J = 0,5, 7,9$ Hz, 1H); 6,64 (dd, $J = 0,8, 8,2$ Hz, 1H); 4,73 (br s, 2H). MS (ES): m/z 265,0 (M^+).

2-Amino-6-cloro-N-(2-metoxifenilo)benzamida (1l)

[0202] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-6-clorobenzoico (2,0 g, 11,7 mmol) y SOCl_2 (2,1 mL, 29,1 mmol) en benceno (60 mL), seguido de o-anisidina (2,6 mL, 23,4 mmol) y CHCl_3 (60 mL). El producto se cromatógrafió en CH_2Cl_2 para proporcionar 2,61 g de un aceite amarillo oscuro (81%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 8,53 (dd, $J = 1,7, 7,9$ Hz, 1H); 8,39 (br s, 1 H); 7,11 (dt, $J = 1,6, 7,8$ Hz, 1H); 7,09 (t, $J = 8,1$ Hz, 1 H); 7,02 (dt, $J = 1,4, 7,8$ Hz, 1H); 6,92 (dd, $J = 1,4, 8,0$ Hz, 1H); 6,62 (dd, $J = 0,9, 8,2$ Hz, 1H); 4,66 (br s, 2H); 3,87 (s, 3H). MS (ES): m/z 277,0 (M^+).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-3-trifluorometilbenzamida (1m)

[0203] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 3-trifluorometilantranílico (2,0 g, 9,75 mmol) y SOCl_2 (1,8 mL, 24,4 mmol) en benceno (50 mL), seguido de 2-cloroanilina (2,1 mL, 19,5 mmol) y CHCl_3 (50 mL). El producto se purificó por recristalización en MeOH para proporcionar 2,38 g de cristales amarillos (78%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 8,40 (dd, $J = 1,4, 8,3$ Hz, 1H); 8,25 (br s, 1H); 7,71 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,60 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,43 (dd, $J = 1,4, 8,0$ Hz, 1H); 7,34 (dt, $J = 1,3, 7,9$ Hz, 1H); 7,11 (dt, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 6,77 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 6,24 (br s, 2H). MS (ES): m/z 315,0 (M^+).

Ácido 3-aminonaftaleno-2-carboxílico (2-clorofenilo)amida (1n)

[0204] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 3-amino-2-naftoico (2,0 g, 10,7 mmol) y SOCl_2 (1,9 mL, 26,7 mmol) en benceno (50 mL), seguido de 2-cloroanilina (2,3 mL, 21,4 mmol) y CHCl_3 (50 mL). El producto se recristalizó en MeOH para proporcionar 1,71 g de un sólido marrón (54%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 10,88 (br s, 1H); 9,21 (s, 1 H); 8,91 (s, 1 H); 8,70 (dd, $J = 1,0, 8,3$ Hz, 1H); 7,95-8,01 (m, 1H); 7,87-7,94 (m, 1H); 7,60-7,68 (m, 2H); 7,41 (dd, $J = 1,3, 8,0$ Hz, 1H); 7,34 (dt, $J = 1,2, 7,8$ Hz, 1H); 7,07 (dt, $J = 1,4, 7,7$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 297,1 (M^+).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-4-nitrobenzamida (1o)

[0205] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 4-nitroantranílico (5,0 g, 27,5 mmol) y SOCl_2 (5,0 mL, 68,6 mmol) en benceno (150 mL), seguido de 2-cloroanilina (5,8 mL, 55,0 mmol) y CHCl_3 (150 mL). El producto se purificó por cromatografía en CH_2Cl_2 seguido de recristalización en MeOH para proporcionar 2,20 g de un sólido naranja-marrón (31%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 8,41 (dd, $J = 1,3, 8,3$ Hz, 1H); 8,31 (br s, 1 H); 7,67 (d, $J = 8,6$ Hz, 1 H); 7,57 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H); 7,52 (dd, $J = 2,2, 8,5$ Hz, 1H); 7,44 (dd, $J = 1,3, 8,1$ Hz, 1H); 7,35 (dt, $J = 1,3, 7,9$ Hz, 1H); 7,13 (dt, $J = 1,4, 7,8$ Hz, 1H); 5,88 (br s, 2H). MS (ES): m/z 292,0 (M^+).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-5-hidroxibenzamida (1p)

[0206] Preparado de acuerdo con el Procedimiento A usando ácido 2-amino-5-hidroxibenzoico (5,0 g, 32,7 mmol) y SOCl_2 (6,0 mL, 81,6 mmol) en benceno (150 mL), seguido de 2-cloroanilina (6,9 mL, 65,4 mmol) y CHCl_3 (150 mL). El producto se purificó mediante dos cromatografías en MeOH/ CH_2Cl_2 para proporcionar 990 mg de un sólido marrón (12%). $^1\text{H RMN}$ (MeOH- d_4) δ : 7,92 (dd, $J = 1,6, 8,1$ Hz, 1H); 7,48 (dd, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 7,34 (dt, $J = 1,5, 7,7$ Hz, 1H); 7,20 (dt, $J = 1,7, 7,7$ Hz, 1H); 7,16 (d, $J = 2,7$ Hz, 1 H); 6,83 (dd, $J = 2,7, 8,7$ Hz, 1H); 6,76 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 6,24 (br s, 2H). MS (ES): m/z 263,0 (M^+).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-4,5-difluorobenzamida (1q)

[0207] Preparado según el Procedimiento A utilizando ácido 4,5-difluoroantranílico (2,0 g, 11,6 mmol) y SOCl_2 (2,1 mL, 28,9 mmol) en benceno (60 mL), seguido de 2-cloroanilina (2,4 mL, 23,2 mmol) y CHCl_3 (60 mL). El producto se purificó mediante dos cromatografías en CH_2Cl_2 y EtOAc/hexanos para proporcionar 769 mg de un sólido amarillo (23%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 8,69-8,82 (m, 1H); 8,00 (dd, $J = 8,4, 9,0$ Hz, 1H); 7,90 (dd, $J = 8,9, 12$ Hz, 1H); 7,39 (dd, $J = 6,8, 10$ Hz, 1H); 6,53 (dd, $J = 6,6, 12$ Hz, 1H); 6,41 (br s, 2H); 5,79 (br s, 1H). MS (ES): m/z 283,1 (M^+).

2-Amino-N-(2-clorofenilo)-5-fluorobenzamida (1r)

[0208] Preparado según el Procedimiento A usando ácido 2-amino-5-fluorobenzoico (1,0 g, 6,45 mmol) y SOCl_2 (1,2 mL, 16,1 mmol) en benceno (30 mL), seguido de 2-cloroanilina (1,4 mL, 12,9 mmol) y CHCl_3 (30 mL). El producto se trituró a partir de CH_2Cl_2 para proporcionar 985 mg de un sólido amarillo mostaza (58%). $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ : 7,66 (dd, $J = 2,9, 8,7$ Hz, 1H); 7,52-7,55 (m, 1H); 7,32-7,37 (m, 3H); 7,09 (dt, $J = 3,0, 8,5$ Hz, 1H); 6,71 (dd, $J = 4,3, 8,7$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 305,0 ($\text{M}+40$).

EJEMPLO 9**Preparación de compuestos intermedios: Cloruros****2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolina-4-ona (2a)**

[0209] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1a (2,95 g, 9,63 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,3 ml, 28,9 mmol) en ácido acético (30 ml). Purificado por extracción de ac. K_2CO_3 y recristalización en isopropanol para proporcionar 1,61 g de un sólido cristalino marrón (46%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 7,59-7,66 (m, 2H); 7,45-7,56 (m, 3H); 7,20 (s, 1 H); 4,37 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,08 (d, $J = 12$ Hz, 1H); 4,04 (s, 3H); 4,00 (s, 3H). MS (ES): m/z 365,0 (M^+).

6-Bromo-2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2b)

[0210] Preparado según el Procedimiento B con 1b (500 mg, 1,54 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,37 ml, 4,61 mmol) en ácido acético (10 ml). Purificado por recristalización en isopropanol para proporcionar 490 mg de un sólido blanquecino (83%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 8,43 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H); 7,91 (dd, $J = 2,3, 8,7$ Hz, 1H); 7,67 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H); 7,60-7,65 (m, 1H); 7,47-7,56 (m, 2H); 7,52 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H); 7,47-7,56 (m, 1H); 4,37 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,06 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 385,0 (M^+).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona (2c)

[0211] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1c (500 mg, 1,89 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,45 mL, 5,67 mmol) en ácido acético (10 mL). Purificado por extracción de K_2CO_3 acuoso, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 501 mg de un sólido cristalino amarillo (82%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 8,32 (dd, $J = 6,0, 8,9$ Hz, 1H); 7,59-7,66 (m, 1H); 7,50-7,55 (m, 3H); 7,44 (dd, $J = 2,4, 9,4$ Hz, 1H); 7,27 (dt, $J = 2,5, 8,5$ Hz, 1H); 4,37 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,07 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 323,0 (M^+).

6-Cloro-2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2d)

[0212] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1d (500 mg, 1,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,42 mL, 5,33 mmol) en ácido acético (10 mL). Purificado por recristalización en isopropanol para proporcionar 555 mg de un sólido amarillo (92%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 8,27 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H); 7,74 - 7,78 (m, 2H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,48-7,57 (m, 3H); 4,37 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,07 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 339,0 (M^+).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona (2e)

[0213] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1e (500 mg, 1,89 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,45 mL, 5,67 mmol) en ácido acético (10 mL). Purificado por extracción de ac. K_2CO_3 y recristalización en isopropanol para proporcionar 430 mg de un sólido cristalino blanquecino (70%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 7,76 (dt, $J = 5,3, 8,2$ Hz, 1H); 7,56-7,65 (m, 2H); 7,47-7,56 (m, 3H); 7,16-7,25 (m, 1H); 4,35 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,07 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 323,0 (M^+).

5-Cloro-2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2f)

[0214] Preparado según el Procedimiento B con 1f (1,00 g, 3,56 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,85 ml, 10,7 mmol) en ácido acético (15 ml). Purificado por recristalización en isopropanol para proporcionar 791 mg de un sólido cristalino blanquecino (65%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 7,70 (s, 1H); 7,68 (d, $J = 3,8$ Hz, 1H); 7,61 - 7,65 (m, 1H); 7,55 (dd, $J = 2,7, 6,4$ Hz, 1H); 7,51 (d, $J = 3,1$ Hz, 1H); 7,50 (s, 2H); 4,35 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,05 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 339,0 (M^+).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (2g)

[0215] Preparado según el Procedimiento B con 1 g (2,18 g, 8,36 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,0 ml, 25,1 mmol) en ácido acético (40 ml). Purificado por dos cromatografías en CH_2Cl_2 y EtOAc/hexanos, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 638 mg de un sólido cristalino blanquecino (24%). 1H RMN ($DMSO-d_6$) δ : 7,73-7,80 (m, 3H); 7,58-7,64 (m, 3H); 7,41 (d, $J = 7,4$ Hz, 1 H); 4,40 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,26 (d, $J = 12$ Hz, 1H); 2,74 (s, 3H). MS (ES): m/z 319,0 (M^+).

8-Cloro-2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2h)

[0216] Preparado según el procedimiento B con 1 h (500 mg, 1,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,49 ml, 6,13 mmol) en ácido acético (10 ml). Purificado por extracción de K_2CO_3 acuoso, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 448 mg de un sólido amarillo (74%). 1H RMN ($CDCl_3$) δ : 8,23 (dd, $J = 1,4, 8,0$ Hz, 1H); 7,90 (dd, $J = 1,4, 7,8$ Hz, 1H); 7,61 - 7,66 (m, 1H); 7,51-7,55 (m, 3H); 7,47 (t, $J = 8,0$ Hz, 1 H); 4,48 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 4,12 (d, $J = 12$ Hz, 1H). MS (ES): m/z 339,0 (M^+).

3-Bifenilo-2-ilo-5-cloro-2-clorometilo-3H-quinazolina-4-ona (2i)

[0217] Preparado según el Procedimiento B con 1i (2,0 g, 6,20 mmol) y cloruro de cloroacetilo (1,5 ml, 18,6 mmol) en ácido acético (30 ml). Purificado por cromatografía en CH_2Cl_2 , seguido de recristalización en isopropanol para

proporcionar 1,44 g de un sólido blanquecino (61%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,61-7,64 (m, 1H); 7,58-7,59 (m, 1H); 7,54-7,57 (m, 2H); 7,52-7,53 (m, 1H); 7,45-7,52 (m, 2H); 7,24 (s, 5 H); 3,92-4,03 (m, 2H). MS (ES): m/z 381,0 (M⁺).

5-Cloro-2-clorometilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (2j)

[0218] Preparado según el procedimiento B con 1j (750 mg, 2,88 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,69 ml, 8,63 mmol) en ácido acético (15 ml). Purificado por cromatografía en CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 340 mg de un sólido blanco (37%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,69 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H); 7,68 (q, *J* = 7,4 Hz, 1H); 7,54 (dd, *J* = 2,2, 7,0 Hz, 1H); 7,35-7,47 (m, 3H); 7,21-7,25 (m, 1H); 4,27 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 4,11 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 2,18 (s, 3H). MS (ES): m/z 319,0 (M⁺).

5-Cloro-2-clorometilo-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2k)

[0219] Preparado según el Procedimiento B con 1k (1,0 g, 3,78 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,90 ml, 11,3 mmol) en ácido acético (20 ml). Purificado por cromatografía en CH₂Cl₂ para proporcionar 484 mg de un sólido rosa pálido (40%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,69 (s, 1H); 7,68 (d, *J* = 3,2 Hz, 1 H); 7,56 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H); 7,54 (d, *J* = 3,0 Hz, 1 H); 7,40-7,47 (m, 1H); 7,35 - 7,38 (m, 1H); 7,27-7,32 (m, 1H); 4,35 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 4,18 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): m/z 323,0 (M⁺).

5-Cloro-2-clorometilo-3-(2-metoxifenilo)-3H-quinazolina-4-ona (2l)

[0220] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1l (2,6 g, 9,41 mmol) y cloruro de cloroacetilo (2,2 ml, 28,2 mmol) en ácido acético (40 ml). Purificado por cromatografía en CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 874 mg de un sólido amarillo pálido (28%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,55-7,74 (m, 2H); 7,47-7,54 (m, 2H); 7,34 (dd, *J* = 1,7, 7,8 Hz, 1H); 7,13 (dt, *J* = 1,2, 7,7 Hz, 1H); 7,08 (dd, *J* = 1,0, 8,4 Hz, 1H); 4,29 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 4,11 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 3,80 (s, 3H). MS (ES): m/z 335,0 (M⁺).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-8-trifluorometilo-3H-quinazolina-4-ona (2m)

[0221] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1 m (500 mg, 1,59 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,38 mL, 4,77 mmol) en ácido acético (10 mL). Purificado por recristalización en isopropanol para proporcionar 359 mg de un sólido cristalino blanco (61%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,51 (dd, *J* = 1,0, 8,0 Hz, 1H); 8,14 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H); 7,65 (dd, *J* = 2,5, 5,6 Hz, 1H); 7,62 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H); 7,48-7,60 (m, 3H); 4,44 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,12 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): m/z 373,0 (M⁺).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-3H-benzo[g]quinazolina-4-ona (2n)

[0222] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1n (500 mg, 1,68 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,40 ml, 5,05 mmol) en ácido acético (10 ml). Purificado por cromatografía en CH₂Cl₂ seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 232 mg de un sólido marrón claro (39%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,92 (s, 1H); 8,29 (s, 1 H); 8,81 (d, *J* = 8,3, 1H); 8,32 (d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,51-7,69 (m, 4H); 7,55 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H); 7,53 (d, *J* = 3,8 Hz, 1H); 4,43 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,12 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): m/z 355,0 (M⁺).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-7-nitro-3H-quinazolina-4-ona (2o)

[0223] Preparado según el Procedimiento B con 1o (500 mg, 1,71 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,41 mL, 5,14 mmol) en ácido acético (10 mL). Se purificó por extracción a partir de K₂CO₃ acuoso, seguido de dos cromatografías en CH₂Cl₂ para proporcionar 338 mg de un aceite amarillo (56%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,64 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 8,48 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H); 8,32 (dd, *J* = 2,2, 8,7 Hz, 1H); 7,66 (dd, *J* = 2,5, 6,0 Hz, 1H); 7,52-7,59 (m, 3H); 4,41 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,10 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): m/z 350,0 (M⁺).

Ácido acético 2-clorometilo-3-(2-clorofenilo)-4-oxo-3,4-dihidro-quinazolina-6-ilo éster (2p)

[0224] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1p (670 mg, 2,55 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,61 mL, 7,65 mmol) en ácido acético (10 mL). Purificado por cromatografía en MeOH al 0-3%/CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 523 mg del acetato como cristales de durazno pálido (57%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,00 (d, *J* = 2,7 Hz, 1H); 7,82 (d, *J* = 8,8 Hz, 1 H); 7,60-7,66 (m, 1H); 7,56 (dd, *J* = 2,7, 8,8 Hz, 1H); 7,51 (t, *J* = 4,7 Hz, 2H); 7,50 (s, 1 H); 4,38 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,08 (d, *J* = 12 Hz, 1H); 2,36 (s, 3H). MS (ES): m/z 363,0 (M⁺).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-6,7-difluoro-3H-quinazolina-4-ona (2q)

[0225] Preparado según el Procedimiento B con 1q (700 mg, 2,48 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,60 ml, 7,43 mmol) en ácido acético (12 ml). Purificado por cromatografía en CH₂Cl₂, seguido de recristalización en isopropanol para proporcionar 219 mg de un sólido cristalino amarillo (26%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 8,07 (dd, *J* = 8,5, 9,7 Hz, 1H); 7,64 (dd, *J* = 2,5, 5,6 Hz, 1H); 7,60 (dd, *J* = 3,5, 11 Hz, 1H); 7,55 (q, *J* = 2,9 Hz, 3H); 7,52 (d, *J* = 1,9 Hz, 1 H); 7,49-7,51 (m, 1H); 4,36 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,06 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): m/z 341,0 (M⁺).

2-Clorometilo-3-(2-clorofenilo)-6-fluoro-3H-quinazolina-4-ona (2r)

[0226] Preparado de acuerdo con el Procedimiento B con 1r (850 mg, 3,21 mmol) y cloruro de cloroacetilo (0,77 mL, 9,63 mmol) en ácido acético (15 mL). Purificado por extracción de K₂CO₃ acuoso, seguido de cromatografía en EtOAc/hexanos. Una segunda cromatografía en acetona/hexanos proporcionó 125 mg de un sólido blanco (12%). ¹H RMN (CDCl₃) δ: 7,95 (dd, *J* = 2,9, 8,2 Hz, 1H); 7,81 (dd, *J* = 4,8, 9,0 Hz, 1H); 7,61 - 7,66 (m, 1H); 7,57 (dd, *J* = 2,7, 8,6 Hz, 1H); 7,57 (dd, *J* = 2,7, 8,6 Hz, 1H); 7,52 (dd, *J* = 3,2, 6,9 Hz, 1H); 7,52 (br s, 2H); 4,38 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 4,08 (d, *J* = 12 Hz, 1H). MS (ES): *m/z* 323,0 (M⁺).

EJEMPLO 10**Preparación de compuestos inhibidores de PI3Kδ****Compuesto D-001****2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-6,7-dimetoxi-3H-quinazolina-4-ona**

[0227] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2a (200 mg, 0,546 mmol), adenina (81 mg, 0,601 mmol), K₂CO₃ (83 mg, 0,601 mmol) y DMF (4 mL). El producto bruto se recrystalizó en etanol (EtOH) para proporcionar 164 mg de un sólido beige (65%), mp 281,5-282,7°C (se descompone). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1 H); 7,76-7,81 (m, 1H); 7,70-7,76 (m, 1H); 7,60-7,67 (m, 2H); 7,45 (s, 1 H); 7,22 (s, 2 H); 6,90 (s, 1 H); 5,08 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,91 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 3,87 (s, 3H); 3,87 (s, 3H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 159,9, 156,2, 155,4, 152,9, 150,0, 149,7, 149,4, 143,0, 141,9, 133,7, 132,1, 131,9, 131,2, 130,8, 129,3, 118,4, 113,6, 108,4, 105,8, 56,5, 56,1, 44,7. MS (ES): *m/z* 464,1 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₂H₁₈ClN₇O₃·0,1C₂H₆O, 0,05KCl, C, 56,47; H 3,97; Cl, 7,88; N 20,76. Encontrado: C, 56,54; H 4,05; Cl, 7,77; N 20,55.

Compuesto D-002**2-(6-Aminopurina-*o*-ilmetilo)-6-bromo-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona**

[0228] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2b (100 mg, 0,260 mmol), adenina (39 mg, 0,286 mmol), K₂CO₃ (40 mg, 0,286 mmol) y DMF (2 mL). El producto bruto se recrystalizó en EtOH para proporcionar 52 mg de un sólido blanquecino (41%), mp 284,2-284,7°C (se descompone). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,24 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 8,05 (s, 1 H); 8,03 (s, 1 H); 7,98 (dd, *J* = 1,9, 8,6 Hz, 1H); 7,74-7,83 (m, 2H); 7,59-7,68 (m, 2H); 7,46 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,22 (s, 2 H); 5,12 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,94 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 159,5, 156,2, 152,9, 152,0, 150,1, 145,8, 141,8, 138,4, 133,1, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,1, 129,4, 128,9, 122,4, 120,4, 118,4, 45,0. MS (ES): *m/z* 482,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃ClBrN₇O, 0,1KCl, C, 49,01; H 2,67; Cl, 7,96; N, 20,00. Encontrado: C, 48,82; H 2,82; Cl, 8,00; N, 19,79.

Compuesto D-003**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-7-fluoro-3H-quinazolina-4-ona**

[0229] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2c (100 mg, 0,310 mmol), adenina (46 mg, 0,340 mmol), K₂CO₃ (47 mg, 0,340 mmol) y DMF (1 mL). El producto bruto se recrystalizó en EtOH para proporcionar 57 mg de un sólido beige (44%), mp 216,8-217,2°C. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,22 (dd, *J* = 6,3, 8,7 Hz, 1H); 8,05 (s, 1 H); 8,03 (s, 1 H); 7,78-7,80 (m, 2H); 7,61 - 7,64 (m, 2H); 7,46 (dt, *J* = 2,1, 8,6 Hz, 1H); 7,32 (d, *J* = 9,8 Hz, 1 H); 7,22 (s, 2H); 5,13 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,95 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 166,1 (d, *J* = 253 Hz), 159,6, 155,8, 152,5, 149,7, 148,6 (d, *J* = 14 Hz), 141,4, 132,8, 131,8, 131,6, 130,8, 130,5, 129,8 (d, *J* = 11 Hz), 129,0, 118,1, 117,4, 116,2 (d, *J* = 24 Hz), 112,7 (d, *J* = 22 Hz), 44,6. MS (ES): *m/z* 422,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃ClFN₇O, 0,1 H₂O (0,15KCl): C, 55,25; H, 3,06; Cl, 9,38; N, 22,55. Encontrado: C, 55,13; H, 2,92; Cl, 9,12; N, 22,30.

Compuesto D-004**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-6-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona**

[0230] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando Intermedio 2d (100 mg, 0,294 mmol), adenina (44 mg, 0,323 mmol), K₂CO₃ (45 mg, 0,323 mmol) y DMF (1 mL). El producto bruto se recrystalizó en EtOH para proporcionar 50 mg de un sólido amarillo (39%), mp 294,5-294,8°C (se descompone). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,10 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 8,05 (s, 1 H); 8,03 (s, 1 H); 7,86 (dd, *J* = 2,4, 8,8 Hz, 1H); 7,75-7,82 (m, 2H); 7,59-7,67 (m, 2H); 7,53 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H); 7,22 (br s, 2H); 5,13 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,95 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 159,7, 156,2, 152,9, 151,9, 150,1, 145,5, 141,8, 135,7, 133,1, 132,3, 132,2, 131,9, 131,1, 130,9, 130,0, 129,4, 125,9, 122,0, 118,4, 44,9. MS (ES): *m/z* 438,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O: C, 54,81; H, 2,99; N 22,37. Encontrado: C, 54,72; H 2,87; N 22,18.

Compuesto D-005**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona**

5 **[0231]** Preparado de acuerdo con el Procedimiento C utilizando el Intermedio 2e (200 mg, 0,619 mmol), adenina (92 mg, 0,681 mmol), K₂CO₃ (94 mg, 0,680 mmol) y DMF (4 mL). El producto bruto se cromatografió en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 168 mg de un sólido blanquecino (64%), mp 159-172°C (se descompone gradualmente). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,10 (s, 1H); 8,08 (s, 1 H); 7,73-7,89 (m, 3H); 7,57-7,71 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 2H); 7,34 (d, *J* = 11 Hz, 1 H); 7,30 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 5,14 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,94 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 160,8 (d, *J* = 264 Hz), 157,5 (d, *J* = 4,2 Hz), 155,8, 152,4, 152,4, 150,0, 148,7, 142,1, 136,4 (d, *J* = 11 Hz), 133,0, 132,2, 132,1, 131,2, 130,9, 129,4, 123,8 (d, *J* = 3,6 Hz), 118,4, 114,5 (d, *J* = 20 Hz), 110,2 (d, *J* = 6,0 Hz), 44,9. MS (ES): *m/z* 422,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃ClFN₇O: C, 56,95; H, 3,11; Cl, 8,40; N 23,24. Encontrado: C, 54,62; H 3,32; Cl, 9,40; N 21,29.

15 Compuesto D-006**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona**

20 **[0232]** Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando Intermedio 2f (300 mg, 0,883 mmol), adenina (131 mg, 0,972 mmol), K₂CO₃ (134 mg, 0,972 mmol) y DMF (4 ml). El producto bruto se cromatografió en MeOH/CH₂Cl₂ y se recristalizó en EtOH para proporcionar 188 mg de un sólido cristalino de color naranja pálido (49%), mp 245,7-246,0 °C (comienza a sudar a 220°C). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,06 (s, 1H); 8,04 (s, 1 H); 7,76-7,81 (m, 2H); 7,72 (d, *J* = 8,0 Hz, 1 H); 7,59-7,66 (m, 3H); 7,41 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H); 7,26 (br s, 2H); 5,11 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,93 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 158,5, 156,2, 152,9, 152,2, 150,1, 149,2, 141,8, 135,4, 133,3, 133,2, 132,1, 132,0, 131,2, 130,9, 130,4, 129,4, 127,3, 118,4, 117,7, 44,9. MS (ES): *m/z* 438,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O 0,1C₂H₆O 0,05H₂O: C, 54,67; H, 3,11; Cl, 15,98; N 22,09. Encontrado: C, 54,35; H, 3,00; Cl, 15,82; N 22,31.

Compuesto D-007**30 2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-clorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona**

[0233] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando Intermedio 2g (250 mg, 0,783 mmol), adenina (116 mg, 0,862 mmol), K₂CO₃ (119 mg, 0,862 mmol) y DMF (4 mL). El producto bruto se recristalizó en EtOH para proporcionar 93 mg de un sólido amarillo pálido (28%), mp 190,7-190,9°C. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,05 (s, 1H); 8,03 (s, 1 H); 7,76 - 7,79 (m, 1H); 7,71 - 7,74 (m, 1H); 7,59-7,67 (m, 1H); 7,34 (d, *J* = 7,4 Hz, 1 H); 7,28 (d, *J* = 8,2 Hz, 1 H); 7,24 (br s, 2H); 5,07 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,92 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 2,73 (s, 3H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 161,1, 156,2, 152,8, 150,9, 150,1, 148,3, 141,9, 141,0, 134,6, 133,6, 132,2, 131,9, 131,3, 130,8, 130,3, 129,3, 125,9, 119,1, 118,4, 44,8, 22,8. MS (ES): *m/z* 418,1 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₁H₁₆ClN₇O H₂O: C, 57,87; H 4,16; Cl, 8,13; N 22,49. Encontrado: C, 57,78; H, 3,99; Cl 8,38; N 22,32.

40

Compuesto D-008**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-8-cloro-3-(2-clorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona**

45 **[0234]** Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando Intermedio 2h (100 mg, 0,294 mmol), adenina (44 mg, 0,324 mmol), K₂CO₃ (45 mg, 0,324 mmol) y DMF (1 mL). El producto bruto se cromatografió en MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar 50 mg de un sólido amarillo pálido (39%), mp 273,3-273,5°C (decoloraciones). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,11 (dd, *J* = 1,3, 8,0 Hz, 1H); 8,08 (s, 1 H); 8,05 (s, 1 H); 8,00 (dd, *J* = 1,3, 7,8 Hz, 1H); 7,79-7,83 (m, 2H); 7,63 - 7,66 (m, 2H); 7,56 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,21 (br s, 2H); 5,17 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,97 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 160,2, 156,1, 152,8, 152,2, 150,2, 143,3, 142,0, 135,6, 133,1, 132,3, 131,9, 131,1, 131,0, 130,9, 129,4, 128,4, 126,0, 122,5, 118,4, 45,0. MS (ES): *m/z* 438,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃Cl₂N₇O 0,1CH₄O 0,6H₂O (0,15KCl): C, 52,09; H, 3,18; N, 21,15. Encontrado: C, 51,85; H, 2,93; N, 21,01.

Compuesto D-009**55 2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-bifenilo-2-ilo-5-cloro-3H-quinazolina-4-ona**

[0235] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando el Intermedio 2i (400 mg, 1,05 mmol), adenina (155 mg, 1,15 mmol), K₂CO₃ (159 mg, 1,15 mmol) y DMF (5 mL). El producto bruto se recristalizó en EtOH para proporcionar 344 mg de un sólido blanco (68%), mp 299,9-300,1°C (decoloraciones). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,08 (s, 1H); 7,89 (s, 1 H); 7,58-7,73 (m, 5H); 7,51 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,46 (d, *J* = 7,5 Hz, 2H); 7,27-7,41 (m, 3H); 7,14-7,27 (m, 3H); 5,14 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 4,82 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 159,6, 156,2, 152,8, 152,5, 150,0, 149,0, 141,7, 140,2, 137,7, 135,0, 133,3, 133,2, 131,8, 130,7, 130,1, 129,8, 129,5, 128,8, 128,6, 128,4, 127,1 118,4, 117,6, 45,3. MS (ES): *m/z* 480,1 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₆H₁₈ClN₇O: C, 65,07; H 3,78; Cl, 7,39; N 20,43. Encontrado: C, 64,77; H 3,75; Cl, 7,43; N 20,35.

65

Compuesto D-012**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-fluorofenilo)-3H-quinazolina-4-ona**

5 **[0236]** Preparado según el Procedimiento C usando Intermedio 2k (210 mg, 0,650 mmol), adenina (97 mg, 0,715 mmol), K₂CO₃ (99 mg, 0,715 mmol) y DMF (4 mL). El producto bruto se recristalizó en EtOH para proporcionar 137 mg de un sólido tostado (50%), mp 295,6-295,8°C (se descompone). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,05 (s, 1H); 8,04 (s, 1H); 7,75 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,74 (t, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,62 - 7,69 (m, 1H); 7,61 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H); 7,47-7,55 (m, 1H); 7,48 (d, *J* = 7,8 Hz, 1H); 7,41 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H); 7,24 (br s, 2H); 5,19 (d, *J* = 17 Hz, 1H); 5,03 (d, *J* = 17 Hz, 1H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 158,7, 157,6 (d, *J* = 250 Hz), 156,2, 152,8, 152,4, 150,0, 149,2, 141,8, 135,4, 133,3, 132,5 (d, *J* = 8,0 Hz), 131,0, 130,4, 127,3, 126,2 (d, *J* = 3,5 Hz), 123,1 (d, *J* = 14 Hz), 118,4, 117,6, 117,2 (d, *J* = 19 Hz), 45,1. MS (ES): *m/z* 422,0 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₀H₁₃ClFN₇O, 0,05C₂H₆O: C, 56,92; H, 3,16; Cl 8,36; N, 23,12. Encontrado: C, 56,79; H, 3,20; O1, 8,46; N 22,79.

15 Compuesto D-029**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-isopropilfenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona**

20 **[0237]** Se añadió cloruro de tionilo (2,2 ml, 30 mmol) a una solución agitada de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (1,51 g, 10 mmol) en benceno (50 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. Una vez enfriado, el disolvente se eliminó a vacío y se separó dos veces con benceno (25 ml). El residuo se disolvió en CHCl₃ (50 ml) y se trató con 2-isopropilanilina (2,83 ml, 20 mmol). La suspensión se calentó luego a reflujo durante 3 h. En ese momento, la TLC (50% EtOAc/hexano) indicó que la reacción se había completado. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió sobre un tapón de 4 cm de gel de sílice y se enjuagó con EtOAc al 20%/hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en HOAc (50 ml) y se trató con cloruro de cloroactilo (1,6 ml, 20 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y se concentró al vacío. El HOAc restante se eliminó por azeótropo con tolueno (25 ml) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y se vertió a través de un tapón de 4 cm de gel de sílice, enjuagando con EtOAc al 20%/hexano. Las fracciones que contenían el producto se identificaron por LCMS (MS (ES): *m/z* 327 (M⁺)), y se concentraron al vacío para proporcionar 975 mg (30%) como una espuma blanca. El cloruro de espuma blanco (450 mg, 1,36 mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se trató con adenina (275 mg, 2,04 mmol) y K₂CO₃ (281 mg, 2,04 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La suspensión se vertió luego en 200 ml de agua, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se enfrió en el refrigerador durante 30 minutos. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío y se recristalizó en EtOH para proporcionar 285 mg (49%) de un sólido blanquecino. mp 258,0-258,2°C. ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,19 (s, 1H), 8,09 (s, 1H), 7,60 (m, 3H), 7,45 (m, 2H), 7,23 (m, 3H), 5,11 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 4,71 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 2,68 (s, 3H), 2,73 (q, *J* = 6,9 Hz, 1H), 1,34 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H), 1,13 (d, *J* = 6,8 Hz, 3H). ¹³C RMN (DMSO-*d*₆) ppm: 161,9, 156,2, 152,8, 151,6, 150,1, 148,4, 146,1, 142,2, 140,8, 134,3, 133,7, 130,6, 130,0, 129,0, 127,7, 127,6, 125,8, 119,2, 118,4, 44,8, 28,3, 24,4, 23,3, 22,9. MS (ES): *m/z* 426,4 (M⁺). Anal. Calc. para C₂₄H₂₃N₇O: C, 67,75; H 5,45; N 23,04. Encontrado: C, 67,60; H 5,45; N 22,82.

40

Compuesto D-030**2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona**

45 **[0238]** Se añadió cloruro de tionilo (2,2 ml, 30 mmol) a una solución agitada de ácido 2-amino-6-metilbenzoico (1,51 g, 10 mmol) en benceno (50 ml) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. Una vez enfriado, el disolvente se eliminó a vacío y se separó dos veces con benceno (25 ml). El residuo se disolvió en CHCl₃ (50 ml) y se trató con o-toluidina (2,13 ml, 20 mmol). La suspensión se calentó luego a reflujo durante 3 h. En ese momento, la TLC (50% EtOAc/hexano) indicó que la reacción se había completado. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se vertió sobre un tapón de 4 cm de gel de sílice y se enjuagó con EtOAc al 20%/hexano. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se concentraron al vacío. El residuo se disolvió en HOAc (50 ml) y se trató con cloruro de cloroactilo (1,6 ml, 20 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y se concentró al vacío. El HOAc restante se eliminó por azeótropo con tolueno (25 ml) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 ml) y se vertió a través de un tapón de 4 cm de gel de sílice, enjuagando con EtOAc/hexano al 20%. Las fracciones que contenían el producto fueron combinadas y concentradas *in vacuo*. El residuo fue disuelto en HOAc (50 mL) y tratado con cloruro de cloroactilo (1,6 mL, 20 mmol) y la mezcla fue calentada en reflujo durante 18 h. La reacción se enfrió y concentró *in vacuo*. El HOAc restante se eliminó por azeotrópica con tolueno (25 mL) tres veces. El residuo se disolvió en tolueno (10 mL) y se introdujo en un tampón de 4 cm de gel de sílice, con enjuague de EtOAc/hexano al 20%. Las fracciones que contenían el producto se identificaron por LCMS [MS (ES): *m/z* 299 (M⁺)], y se concentraron al vacío para proporcionar 476 mg (16%) como una espuma blanca. El cloruro de espuma blanco (470 mg, 1,57 mmol) se disolvió en DMF (10 ml) y se trató con adenina (423 mg, 3,14 mmol) y K₂CO₃ (433 mg, 3,14 mmol) y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Luego se vertió la suspensión en 200 ml de H₂O, se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se enfrió en el refrigerador durante 30 minutos. El sólido resultante se recogió por filtración al vacío y se recristalizó en EtOH para proporcionar 123 mg (20%) de un sólido blanquecino. pf 281,5-282,7°C (se descompone). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,07 (s, 1H); 8,05 (s, 1H); 7,61 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,48 (m, 4H), 7,25 (m, 3H), 5,09 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 4,76 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,18 (s, 3H). ¹³C

65

RMN (DMSO- d_6) ppm: 161,3, 156,2, 152,8, 151,4, 150,0, 148,5, 142,2, 140,9, 136,1, 135,4, 134,3, 131,7, 130,1, 130,0, 129,0, 128,0, 125,8, 119,2, 118,5, 44,8, 22,9 17,4. MS (ES): m/z 398,2 (M^+). Anal. Calc. para $C_{22}H_{19}N_7O$: C, 66,49; H 4,82; N 24,67. Encontrado: C, 66,29; H 4,78; N 24,72.

5 Compuesto D-032

2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona

10 [0239] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 2j (200 mg, 0,626 mmol), adenina (93 mg, 0,689 mmol), K_2CO_3 (95 mg, 0,689 mmol) y DMF (3 mL). El producto bruto se cromatografió en MeOH/ CH_2Cl_2 para proporcionar 101 mg de un sólido blanquecino (39%), mp 262,0-266,5°C. 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,08 (s, 1H); 8,07 (s, 1H); 7,70 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,58 (dd, $J = 0,6, 7,9$ Hz, 1H); 7,43-7,57 (m, 4H); 7,36 (dd, $J = 0,7, 8,0$ Hz, 1H); 7,26 (br s, 2H); 5,12 (d, $J = 18$ Hz, 1H); 4,78 (d, $J = 18$ Hz, 1H); 2,20 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) ppm: 158,7, 156,2, 152,9, 152,7, 150,0, 149,4, 142,1, 136,1, 135,1, 135,0, 133,2, 131,8, 130,3, 130,1, 128,9, 128,1, 127,2, 118,5, 117,9, 44,9, 17,4. MS (ES): m/z 418,1 (M^+). Anal. Calc. para $C_{21}H_{16}ClN_7O \cdot 0,1H_2O \cdot 0,05KCl$: C, 59,57; H 3,86; Cl 8,79; N 23,16. Encontrado: C, 59,65; H 3,80; Cl, 8,70; N 22,80.

Compuesto D-033

20 2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-5-cloro-3-(2-metoxifenilo)-3H-quinazolina-4-ona

25 [0240] Preparado de acuerdo con el Procedimiento C usando 21 (250 mg, 0,746 mmol), adenina (111 mg, 0,821 mmol), K_2CO_3 (113 mg, 0,821 mmol) y DMF (4 mL). El producto bruto se cromatografió en MeOH/ CH_2Cl_2 y se recristalizó en EtOH para proporcionar 124 mg de un sólido marrón (38%), mp 257,0-257,1°C. 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,06 (s, 1H); 8,01 (s, 1H); 7,71 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,57 (dd, $J = 0,9, 7,9$ Hz, 1H); 7,52-7,59 (m, 1H); 7,50 (dd, $J = 1,6, 7,8$ Hz, 1H); 7,38 (dd, $J = 1,1, 8,2$ Hz, 1H); 7,27 (dd, $J = 0,6, 8,3$ Hz, 1H); 7,24 (br s, 2H); 7,17 (dt, $J = 0,9, 7,6$ Hz, 1H); 5,07 (d, $J = 17$ Hz, 1H); 4,97 (d, $J = 17$ Hz, 1H); 3,79 (s, 3H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6) ppm: 158,8, 156,2, 154,7, 153,2, 152,8, 150,1, 149,3, 142,0, 135,1, 133,2, 131,8, 130,1, 130,1, 127,2, 123,8, 121,6, 118,4, 117,9, 113,1, 56,2, 44,8. MS (ES): m/z 434,0 (M^+). Anal. Calc. para $C_{21}H_{16}ClN_7O_2 \cdot 0,5H_2O \cdot 0,04KCl$: C, 56,57; H 3,84; Cl, 8,27; N, 21,99. Encontrado: C, 56,29; H 3,75; Cl, 8,21; N 21,61.

[0241] Los siguientes compuestos se hicieron generalmente de acuerdo con los métodos descritos anteriormente y sirven para ilustrar adicionalmente realizaciones específicas de los compuestos de la invención:

- 35 2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-fluorofenilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-048)
2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-bencilo-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona (D-049)
2-(6-aminopurina-9-ilmetilo)-3-morfolina-4-ilo-3H-quinazolina-4-ona, sal de acetato (D-051)

40 [0242] Se prepararon compuestos adicionales de la presente invención mediante los siguientes procedimientos sintéticos.

[0243] Los siguientes intermedios se prepararon mediante el Procedimiento A descrito anteriormente.

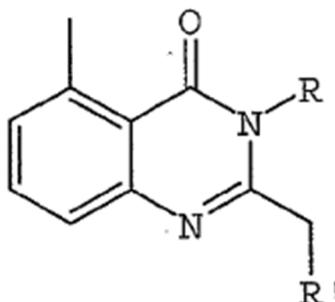


- 55 3a R= ciclopropilo
3b R= ciclopropilmetilo
3d R= ciclopentilo
3e R= 3-(2-cloro)piridilo
60 3h R= ciclohexilo

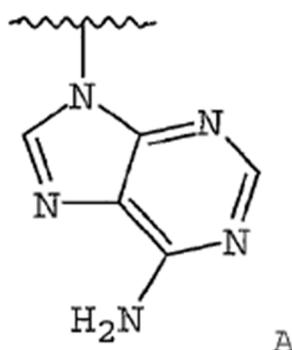
[0244] Los compuestos adicionales de la presente invención (D-053 a D-070) que tienen la siguiente estructura central se discuten en la siguiente Sección Experimental. Todos fueron preparados siguiendo el Procedimiento C.

65 Estructura central:

[0245]



Nº de compuesto	R	R'
D-055	ciclopropilmetilo	A
D-060	ciclopentilo	A
D-062	3-(2-cloro)piridilo	A
D-065	ciclopropilo	A
D-068	ciclohexilo	A



2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-ciclopropilmetilo-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-055)

[0246] Preparado según el procedimiento C usando 3b (300 mg, 1,14 mmol), adenina (170 mg, 1,26 mmol) y K_2CO_3 (189 mg, 1,37 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O , seguido de recristalización en MeOH. 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,21 (s, 1H); 8,10 (s, 1H); 7,52 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,18-7,31 (m, 3H); 7,06 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,68 (s, 2H); 4,14 (d, $J = 6,8$ Hz, 2H); 2,77 (s, 3H); 1,34 (quint, $J = 6,4$ Hz, 1H); 0,45-0,60 (m, 4H). MS (ES): m/z 362 (M+H), 308.

2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-ciclopentilo-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-060)

[0247] Preparado según el procedimiento C usando 3d (100 mg, 0,36 mmol), adenina (58 mg, 0,43 mmol) y K_2CO_3 (100 mg, 0,72 mmol). El producto se purificó por recristalización en MeOH. 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,15 (s, 1H); 8,11 (s, 1H); 7,52 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,16-7,31 (m, 3H); 7,10 (d, $J = 8,0$ Hz, 2H); 5,68 (s, 2H); 4,78 (quint, $J = 8,3$ Hz, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09-2,32 (m, 2H); 1,86-2,04 (m, 2H); 1,68-1,86 (m, 2H); 1,43-1,67 (m, 2H). MS (ES): m/z 376 (M+H), 308, 154.

2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-(2-cloro-piridina-3-ilo)-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-062)

[0248] Preparado según el procedimiento C usando 3e (500 mg, 1,6 mmol), adenina (230 mg, 1,7 mmol) y K_2CO_3 (262 mg, 1,9 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O . 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,59 (dd, $J = 1,7, 4,8$ Hz, 1H); 8,22 (dd, $J = 1,7, 7,8$ Hz, 1H); 8,025 (s, 1H); 8,017 (s, 1H); 7,60-7,72 (m, 2H); 7,35 (t, $J = 8,2$ Hz, 2H); 7,22 (s, 2H); 5,12 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H); 5,02 (d, $J = 17,0$ Hz, 1H); 2,72 (s, 3H). MS (ES): m/z 419 (M+H).

2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-ciclopropilo-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-065)

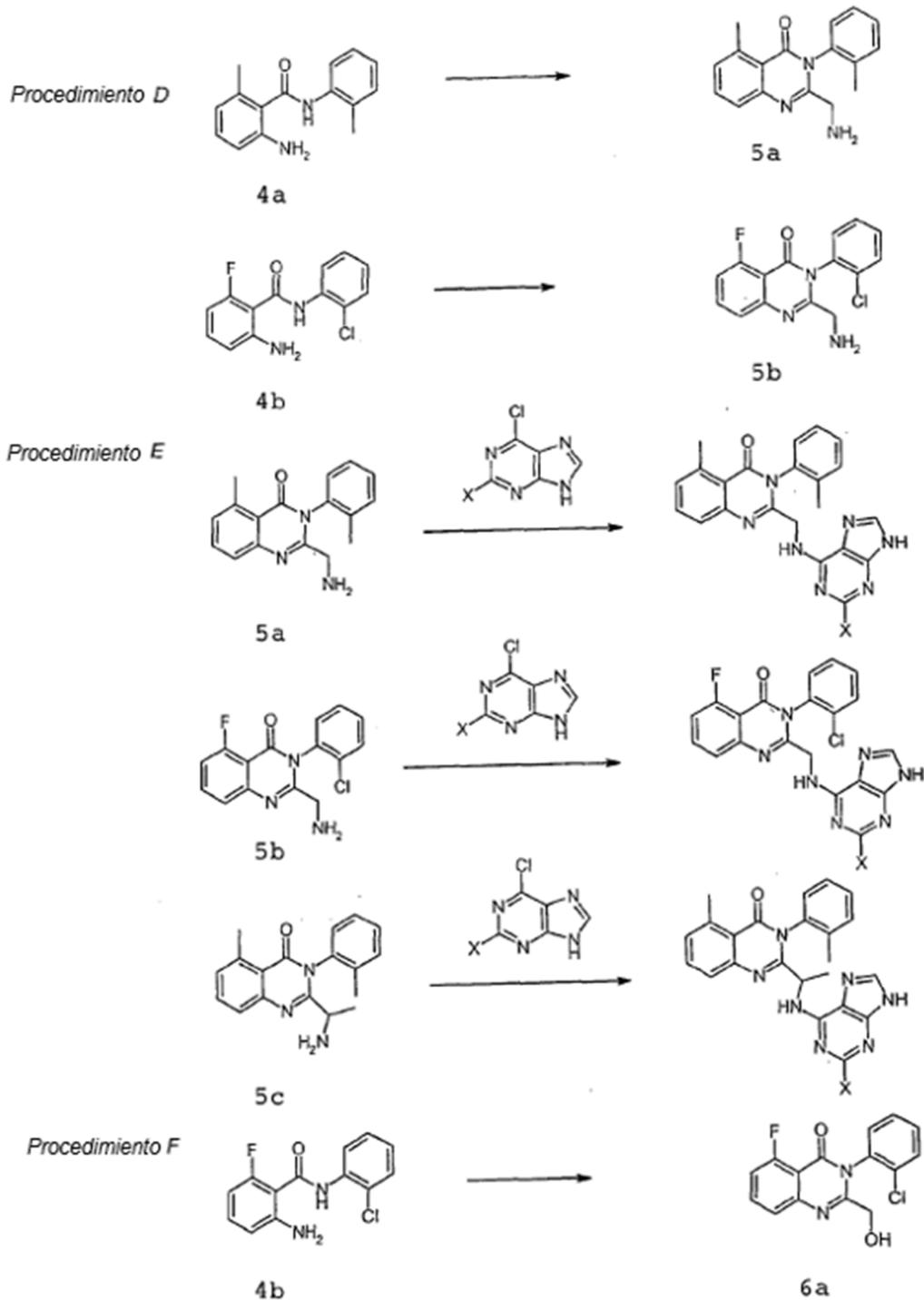
[0249] Preparado según el procedimiento C usando 3a (100 mg, 0,40 mmol), adenina (94 mg, 0,7 mmol) y K_2CO_3 (121 mg, 0,88 mmol). El producto se purificó por trituración a partir de H_2O . 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,19 (d, $J = 0,9$ Hz, 1H);

8,09 (d, $J = 1,0$ Hz, 1H); 7,48 (t, $J = 7,8$ Hz, 1 H); 7,13-7,29 (m, 3H); 7,04. (D, $J = 8,1$ Hz, 1H); 5,74 (s, 2H); 3,00-3,13 (m, 1H); 2,73 (s, 3H); 1,18-1,38 (m, 2H); 0,94-1,09 (m, 2H).

2-(6-Aminopurina-9-ilmetilo)-3-ciclohexilo-5-metilo-3H-quinazolina-4-ona (D-068)

[0250] Preparado de acuerdo con el procedimiento C utilizando 3 h (150 mg, 0,52 mmol), adenina (77 mg, 0,57 mmol) y K_2CO_3 (86 mg, 0,62 mmol). El producto se purificó por tritución a partir de MeOH. 1H RMN (DMSO- d_6) δ : 8,15 (s, 2H); 7,54 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H); 7,06-7,35 (m, 4H); 5,65 (s, 2H); 4,09 (br s, 1 H); 2,73 (s, 3H); 1,41-1,90 (m, 6H); 0,99-1,34 (m, 4H). MS (ES): m/z 390 (M+H), 308.

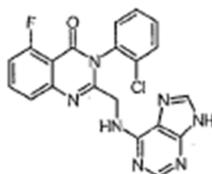
[0251] Compuestos adicionales de la invención siguen, junto con la ruta sintética a compuestos D-071 a D-074, D-076, D-080, D-085, D-090, D-091, D-099, D-100 y D-105 a D-109.



[0252] Procedimiento D: Una mezcla de amida 4a o 4b, FMOC-cloruro de glicilo y ácido acético glacial se calentó a 120°C durante 1 a 4 horas. La mezcla resultante se concentró al vacío y se purificó por cromatografía flash para proporcionar la amina ciclada protegida. Este material se combinó con 10 equivalentes de octanetriol y una cantidad catalítica de DBU en THF y se agitó a temperatura ambiente hasta que LCMS indicó el consumo del material de partida. La reacción se vertió directamente sobre una columna instantánea (equilibrada en CH₂Cl₂) y se eluyó con MeOH/CH₂Cl₂ al 0-5% para proporcionar la amina libre, 5a o 5b. El compuesto 5c se preparó de manera análoga usando (±) FMOC-alanilo-cloruro en lugar de FMOC-glicilo cloruro.

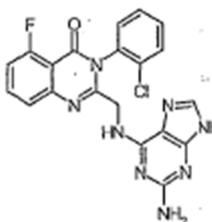
[0253] Procedimiento E: Cantidades equimolares de 5a o 5b, la 6-cloropurina apropiada y DIEA se combinaron con EtOH en un vial pequeño y se calentaron a 80°C. La reacción se controló regularmente por LCMS y se purificó como se indica.

[0254] Procedimiento F: Una mezcla de amida 4b, cloruro de acetoxiacetilo y ácido acético glacial se calentó a 120°C y se agitó durante 2 horas. La reacción enfriada se filtró y los sólidos se lavaron con CH₂Cl₂ para proporcionar el acetato ciclado como un sólido blanco. Este material se combinó con K₂CO₃ en metanol acuoso y se agitó durante una hora, luego se concentró al vacío. Los sólidos resultantes se trituraron de H₂O para proporcionar 6a como un sólido blanco.



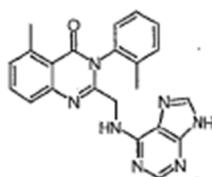
3-(2-Clorofenilo)-5-fluoro-2-[(9H-purina-6-ilamino)-metilo]-3H-quinazolina-4-ona (D-072)

[0255] Preparado de acuerdo con el procedimiento E usando 5b (50 mg, 0,165 mmol) y 6-cloropurina (26 mg, 0,165 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 5 días, la reacción se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min, detector a 220 λ). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12,99 (br s, 1H); 8,14 (br s, 1H); 8,12 (s, 1H); 7,85 (dt, *J* = 5,7, 8,1 Hz., 1H); 7,68 - 7,79 (m, 3H); 7,57 (t, *J* = 6,2 Hz., 1H); 7,57 (d, *J* = 7,7 Hz., 1H); 7,50 (d, *J* = 8,1 Hz., 1H); 7,35 (dd, *J* = 8,4, 10,7 Hz., 1H); 4,15-4,55 (m, 2H). MS (ES): *m/z* 422 (M+H), 211.



2-[(2-Amino-9H-purina-6-ilamino)metilo]-3-(2-clorofenilo)-5-fluoro-3H-quinazolina-4-ona (D-074)

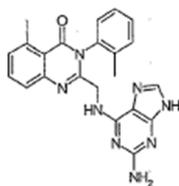
[0256] Preparado de acuerdo con el procedimiento E usando 5b (50 mg, 0,165 mmol) y 2-amino-6-cloropurina (28 mg, 0,165 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 5 días, la reacción se purificó por HPLC (columna Luna C18, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min, detector a 220 λ). ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 12,13 (br s, 1H); 7,86 (dt, *J* = 5,6, 8,2 Hz., 1H); 7,76-7,83 (m, 2H); 7,68 (br s, 1H); 7,61 (t, *J* = 5,7 Hz., 1H); 7,61 (d, *J* = 7,2 Hz., 1H); 7,53 (d, *J* = 8,2 Hz., 1H); 7,35 (dd, *J* = 8,2, 10,9 Hz., 1H); 5,66 (br s, 2H); 4,16-4,50 (m, 1H); 4,09 (q, *J* = 5,3 Hz., 2H). MS (ES): *m/z* 437 (M+H), 219.



5-Metilo-2-[(9H-purina-6-ilamino)metilo]-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-071)

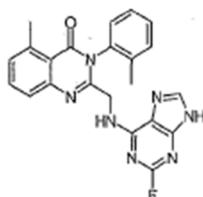
[0257] Preparado según el procedimiento E usando 6-cloropurina (11 mg, 0,072 mmol) y 5a (20 mg, 0,072 mmol). Después de 5 días, la reacción se interrumpió con agua y la suspensión resultante se filtró. Los sólidos se purificaron por HPLC (columna Luna C18, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al

100% a los 18 min, detector a 220 λ). ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 12,98 (br s, 1H); 8,14 (br s, 1 H); 8,10 (s, 1 H); 7,58-7,79 (m, 2H); 7,37-7,48 (m, 4H); 7,26-7,36 (m, 2H); 3,93-4,39 (m, 2H); 2,75 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). MS (ES): m/z 398 (M+H), 199.



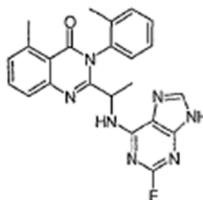
2-[(2-Amino-9H-purina-6-ylamino)metilo]-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-073)

[0258] Preparado de acuerdo con el procedimiento E usando 5a (189 mg, 0,677 mmol) y 2-amino-6-cloropurina (115 mg, 0,677) en 3 ml de EtOH. Después de 3 días, la reacción se filtró para eliminar el exceso de purina y el filtrado se purificó por HPLC (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min., detector a 220 λ) para proporcionar 7 mg del producto como la sal de TFA. ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 8,88 (br s, 1H); 8,21 (s, 1 H); 7,71 (t, $J = 7,7$ Hz., 1H); 7,45-7,56 (m, 2H); 7,38-7,44 (m, 3H); 7,35 (d, $J = 7,5$ Hz., 1H); 7,30 (br s, 1 H); 4,40 (dd, $J = 4,5, 17,5$ Hz., 1H); 4,27 (dd, $J = 5,3, 17,4$ Hz., 1H); 2,75 (s, 3H); 2,09 (s, 3 H). MS (ES): m/z 413 (M+H), 207, 163.



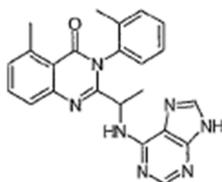
2-[(2-fluoro-9H-purina-6-ylamino)metilo]-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-076)

[0259] Preparado según el procedimiento E usando 5a (20 mg, 0,072 mmol) y 2-fluoro-6-cloropurina (16 mg, 0,094 mmol) en 1 ml de EtOH. Después de 18 horas, la reacción se purificó por HPLC (columna Luna C18, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min, detector a 220 $^\circ\text{C}$) y posteriormente se recristalizó de EtOH para proporcionar 14 mg del producto como un sólido amarillo. ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 13,12 (br s, 1H); 8,40 (br s, 1 H); 8,15 (s, 1 H); 7,66 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,35 - 7,49 (m, 4H); 7,31 (d, $J = 7,2$ Hz., 1H); 4,00-4,22 (m, 2H); 3,17 (s, 1 H); 2,74 (s, 3H); 2,18 (s, 3H). MS (ES): m/z 416 (M+H), 208.



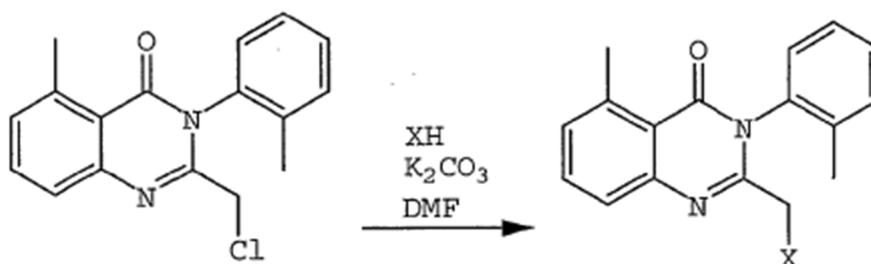
2-[1-(2-Fluoro-9H-purina-6-ylamino)etilo]-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-080)

[0260] Preparado según el procedimiento E usando 5c (50 mg, 0,17 mmol) y 2-fluoro-6-cloropurina (35 mg, 0,204 mmol) en 1,2 ml de EtOH. La purificación por HPLC (columna Luna C18, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min, detector a 220 λ) proporcionó dos atropisómeros como sólidos blancos. Los datos para uno de estos son los siguientes: ^1H RMN ($\text{DMSO-}d_6$) δ : 8,48 (br d, $J = 6,4$ Hz, 1H); 8,17 (s, 1 H); 7,69 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,53 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H); 7,44 (d, $J = 7,8$ Hz, 2H); 7,33 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H); 7,07 (br t, $J = 7,2$ Hz, 1H); 4,80 (br t, $J = 6,8$ Hz, 1H); 2,74 (s, 3H); 2,09 (s, 3H); 1,38 (d, $J = 6,7$ Hz, 3H). MS (ES): m/z 430 (M+H), 215.



5-Metilo-2-[1-(9H-purina-6-ilamino)etilo]-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-081)

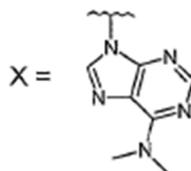
[0261] Preparado según el procedimiento E usando 5c (50 mg, 0,17 mmol) y 6-cloropurina (32 mg, 0,204 mmol) en 1,2 ml de EtOH. La purificación por HPLC (columna Luna C18, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 min, acetonitrilo al 100% a los 18 min, detector a 220λ) proporcionó dos atropisómeros como sólidos amarillos. Los datos para uno de estos son los siguientes: ¹H RMN (DMSO-*d*₆) δ: 8,39 (br s, 1H); 8,34 (s, 1 H); 8,18 (s, 1 H); 7,71 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H); 7,56 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H); 7,49 (d, *J* = 6,9 Hz, 1 H); 7,28 -7,43 (m, 3H); 7,20 (br s, 1H); 5,06 (br s, 1H); 2,73 (s, 3H); 2,04 (s, 3H); 1,51 (d, *J* = 6,6 Hz, 3H). MS (ES): *m/z* 412 (M+H), 206.



[0262] Los siguientes compuestos de la presente invención se prepararon como se describe en el Procedimiento C, usando 2-clorometilo-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (10 mg), el nucleófilo apropiado XH (20 mg, exceso) y carbonato de potasio (10 mg) en DMF (0,25 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente, se inactivó con agua, y el producto sólido bruto se recogió por filtración y se secó al aire. El material bruto se disolvió en 0,5 ml de DMSO y se purificó por HPLC de fase inversa (columna C18 Luna, 4,6 x 250 mm, 4,7 ml/min, acetonitrilo al 10-75%/agua durante 15 minutos, acetonitrilo al 100% a los 18 minutos, detector a 220λ). Las fracciones apropiadas se concentraron al vacío para producir los productos finales.

2-(6-Dimetilaminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-082)

[0263]



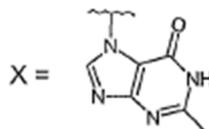
[0264] Rendimiento: 8,1 mg.

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

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

5-Metilo-2-(2-metilo-6-oxo-1,6-dihidro-purina-7-ilmetilo)-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-083)

[0265]



[0266] Rendimiento: 3,3 mg.

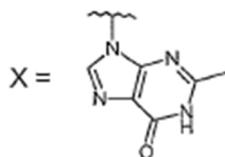
¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ: 12,06 (s, 1H), 8,12 (s, 1H), 7,60 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,38 (m, 4H), 7,30 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 5,26 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 4,94 (d, *J* = 17,4 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,32 (s, 3H), 2,24 (s, 3H). La alquilación en la purina N₇ asignada arbitrariamente en función del desplazamiento en el campo de los protones de metileno debido al grupo carbonilo.

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

5-Metilo-2-(2-metilo-6-oxo-1,6-dihidro-purina-9-ilmetilo)-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-084)

[0267]

5



10

[0268] Purificado de la misma mezcla de reacción que D-083. Rendimiento: 3,6 mg.

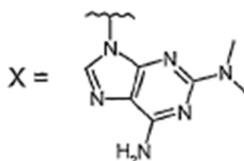
¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 12,17 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,63 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,57-7,39 (m, 4H), 7,32 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,26 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,08 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,70 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,27 (s, 3H), 2,17 (s, 3H).

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

2-(Amino-dimetilaminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-085)

[0269]

20



25

[0270] Rendimiento: 6,7 mg.

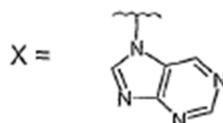
¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 7,66 (s, 1H), 7,61 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,40 (m, 4H), 7,32-7,26 (m, 2H), 6,74 (s, 2H), 4,94 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 4,63 (d, J = 17,2 Hz, 1H), 2,97 (s, 6H), 2,73 (s, 3H), 2,17 (s, 3H), 2,08 (s, 3H).

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

5-metilo-2-purina-7-ilmetilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-090)

[0271]

40



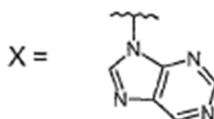
45 [0272] ¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 9,04 (s, 1H), 8,97 (s, 1H), 8,48 (s, 1H), 7,65-7,54 (m, 2H), 7,53-7,39 (m, 3H), 7,31 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,31 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 5,16 (d, J = 17,6 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,09 (s, 3H). La alquilación en la purina N₇ se determinó mediante potenciación de NOE entre el protón de la posición 6 de la purina y los protones de metileno en el conector entre los grupos de quinazolinona y la purina.

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

5-metilo-2-purina-9-ilmetilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-091)

[0273]

55



60

[0274] De la misma reacción que produjo D-090.

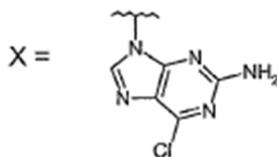
65 ¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO) δ: 9,17 (s, 1H), 8,86 (s, 1H), 8,55 (s, 1H), 7,59 (t, J = 7,8 Hz, 1H), 7,55-7,42 (m, 4H), 7,30 (d, J = 7,4 Hz, 1H), 7,13 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,26 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 4,92 (d, J = 17,5 Hz, 1H), 2,73 (s, 3H), 2,19 (s, 3H). Alquilación en la purina N₉ sugerida por la falta de potenciación de NOE entre los protones de la posición 6 de la purina y los protones de metileno de enlace.

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

2-(2-amino-6-cloro-purina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-099)

5 [0275]

10

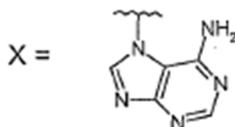


15 [0276] LRMS (ES pos.) 432 (M+1).

2-(6-aminopurina-7-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-100)

20 [0277]

20



25

[0278] ^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO) δ : 8,19 (s, 3H), 7,66 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,59-7,43 (m, 5H), 7,34 9d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 7,23 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 6,90 (s, 2H), 5,21 (cuarteto AB, $J_{AB} = 17,4$ Hz, $\Delta v = 22,1$ Hz, 2H), 2,72 (s, 3H), 1,93 (s, 3H) La alquilación en la purina N7 se confirmó mediante mejoras de NOE entre los siguientes protones: 1) amina exocíclica y protones de metileno; 2) Protones de amina exocíclica y toluilo metilo.

30

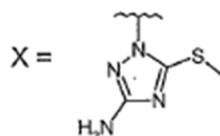
LRMS (ES pos.) $M/z = 398 (M+1)$.

2-(3-Amino-5-metilsulfanilo-1,2,4-triazol-1-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-105)

35

[0279]

40



45 [0280] Rendimiento: 5,0 mg.

^1H RMN (300 MHz, d_4 -MeOH) δ : 7,67 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,55-7,37 (m, 4H), 7,35-7,27 (m, 2H), 4,77 (d, $J = 17,1$ Hz, 1H), 4,60 (d, $J = 17,1$ Hz, 1H), 2,80 (s, 3H), 2,43 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

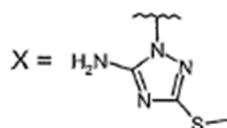
LRMS (ES pos.) $M/z = 393 (M+1)$.

2-(5-Amino-3-metilsulfanilo-1,2,4-triazol-1-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-106)

50

[0281]

55



60

[0282] Rendimiento: 0,6 mg.

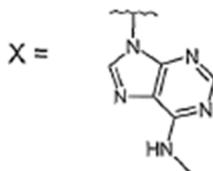
Purificado de la misma mezcla de reacción que D-105.

^1H RMN (300 MHz, d_4 -MeOH) δ : 7,67 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H), 7,50-7,24 (m, 6H), 4,83 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 4,70 (d, $J = 16,5$ Hz, 1H), 2,79 (s, 3H), 2,47 (s, 3H), 2,14 (s, 3H).

65 LRMS (ES pos.) $M/z = 393 (M+1)$.

5-Metilo-2-(6-metilaminopurina-9-ilmetilo)-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-107)**[0283]**

5



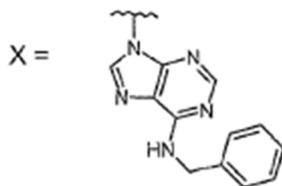
10

[0284] Rendimiento: 5,0 mg

¹H RMN (300 MHz, *d*₄-MeOH) δ: 8,17 (s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,54-7,43 (m 4H), 7,31-7,23 (m, 2H), 5,14 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 4,90 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 3,14 (br s, 3H), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) *M/z* = 412 (*M*+1).

2-(6-Bencilaminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-108)**[0285]**

25



30

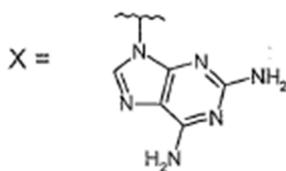
[0286] Rendimiento: 6,7 mg.

¹H RMN (300 MHz, *d*₄-MeOH) δ: 8,13 (s, 1H), 8,04 (s, 1H), 7,58 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,51-7,21 (m, 11H), 5,15 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 4,91 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 4,83 (s, 2H, bajo el pico H₂O), 2,79 (s, 3H), 2,22 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) *M/z* = 488 (*M*+1).

35

2-(2,6-diaminopurina-9-ilmetilo)-5-metilo-3-o-tolilo-3H-quinazolina-4-ona (D-109)

40

[0287]

45

[0288] Duplicó las cantidades de todos los reactivos. Rendimiento: 14 mg.

¹H RMN (300 MHz, *d*₆-DMSO) δ: 8,53 (br s, 2H), 8,01 (s, 1H), 7,64 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 7,53-7,40 (m, 4H), 7,33 (d, *J* = 7,4 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H), 4,96 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 4,64 (d, *J* = 17,5 Hz, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,17 (s, 3H).
LRMS (ES pos.) *M/z* = 413 (*M*+1).

50

Compuesto D-999 (comparativo)**3-(2-Clorofenilo)-2-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ilsulfanilmetilo)-3H-quinazolina-4-ona**

[0289] Un compuesto análogo, 3-(2-clorofenilo)-2-(1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-4-ilsulfanilmetilo)-3H-quinazolina-4-ona, también se sintetizó generalmente de acuerdo con los métodos descritos, excepto que una 4-mercapto-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina fue sustituida por la mercaptopurina en el paso final.

60

EJEMPLO 11**Ensayos bioquímicos de potencia y selectividad PI3K**

65

A. Ensayo bioquímico utilizando ATP 20 μ M

[0290] Usando el método descrito en el Ejemplo 2 anterior, los compuestos de la invención se probaron para determinar la actividad inhibitoria y la potencia contra PI3K δ , y la selectividad para PI3K δ frente a otras isoenzimas de Clase I PI3K. En la Tabla 2, los valores de CI_{50} (μ M) se dan para PI3K α ("Alfa"), PI3K β ("Beta"), PI3 γ ("Gamma") y PI3K δ ("Delta"). Para ilustrar la selectividad de los compuestos, las proporciones de los valores de CI_{50} de los compuestos para PI3K α , PI3K β y PI3K γ con respecto a PI3K δ se dan, respectivamente, como "Relación Alfa/Delta", "Relación Beta/Delta" y "Relación Gamma/Delta".

[0291] Los ensayos de selectividad iniciales se realizaron de manera idéntica al protocolo de ensayo de selectividad en el Ejemplo 2, excepto que se usaron 100 μ L de Ecoscint para la detección de radiomarcadores. Los ensayos de selectividad posteriores se realizaron de manera similar usando los mismos stocks de sustrato 3X, excepto que contenían 0,05 mCi/mL y [32 P]ATP y 3 mM PIP $_2$. Los ensayos de selectividad posteriores también usaron las mismas reservas de enzimas 3X, excepto que ahora contenían 3 nM de cualquier isoforma PI3K dada.

[0292] Para todos los ensayos de selectividad, los compuestos de prueba se pesaron y se disolvieron en reservas de 10-50 mM en DMSO al 100% (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 μ M en agua a partir de la cual se realizó una serie de diluciones al agua en 3 veces. A partir de estas diluciones, se añadieron 20 μ L a los pocillos de ensayo junto con blancos de agua utilizados para el control enzimático (positivo) y el control sin enzima (fondo). El resto del ensayo se realizó esencialmente de acuerdo con el protocolo de ensayo de selectividad en el Ejemplo 2.

[0293] Para aquellos casos en los que la mayor concentración utilizada en el ensayo, es decir, 100 μ M, no inhibió la actividad de la enzima en al menos un 50%, la tabla recita el porcentaje de actividad restante a esa concentración (es decir, a 100 μ M). En estos casos, no se pueden calcular las relaciones de actividad verdaderas para los compuestos, ya que falta uno de los valores de CI_{50} requeridos. Sin embargo, para proporcionar una idea de las características de estos compuestos, se calcula una relación de actividad hipotética utilizando 100 μ M sustituidos por el valor faltante. En tales casos, la relación de selectividad debe ser mayor que el valor hipotético, y esto se indica mediante el uso de un símbolo mayor que (>).

Compuesto	Alfa CI_{50}	Beta CI_{50}	Delta CI_{50}	Gamma CI_{50}	Relación alfa/delta	Relación beta/delta	Relación gamma/delta
D-100*	86%	74%	0,33	7,7	>302	>302	23
D-001	83%	45	68		>1,5	0,66	
D-002	88%	78%	44		>2,3	>2,3	
D-003	92	53%	4		22	>24	
D-004	93%	89%	64		>2	>1,6	
D-005	89%	46	0,8		>121	56	
D-006	78%	6	0,15		>652	38	
D-007	82%	30	0,16		>619	188	
D-008	82%	68	1,2		>85	57	
D-009	82	6	0,12		683	50	
D-012	69%	11	0,17		>588	65	
D-029	49	3,0	0,06		882	54	
D-030	50	5	0,07		758	70	
D-048	70	14	0,16		449	90	
D-049	110%	30	1,0		>100	30	
D-051	89%	57%	3,3		>31	>31	
D-999*	105	71%	47	60	2,2	2,1	1,3
LY294002*	1,2	0,4	0,23		5,3	1,7	

* compuesto comparativo

B. Ensayo bioquímico utilizando 200 μ M de ATP

[0294] En la Parte A, arriba, los compuestos de la invención se probaron para establecer su CI_{50} para la inhibición de las isoformas alfa, beta, delta y gamma de PI3K usando ATP 20 μ M. Se realizó un examen adicional para establecer la CI_{50} para la inhibición de las cuatro isoformas de PI3K a una concentración final de ATP 200 μ M, 10 veces mayor y sustancialmente más cercana a la concentración fisiológica normal de ATP en las células. Este protocolo de selectividad es idéntico al descrito anteriormente, excepto que la concentración de ATP original 3X fue de 600 μ M. Los

datos de este ensayo se resumen en la Tabla 3, a continuación. La sensibilidad observada a la concentración de ATP sugiere que estos compuestos inhibidores de PI3K δ actúan como competidores de ATP.

5

10

15

20

Compuesto	Alfa CI ₅₀	Beta CI ₅₀	Delta CI ₅₀	Gamma CI ₅₀	Relación alfa/delta	Relación beta/delta	Relación gamma/delta
D-000*	91±1%	84±2%	2±1	35±35	91	84	18
D-005	104%	82%	11	91%	20	16	17
D-006	104±1%	44±5	0,92±0,1	87±33	226	48	95
D-007	92±11%	72±12	0,73±0,2	88±4	252	99	121
D-009	70%	18	0,7	53	200	26	76
D-012	70±4%	108±4	1,3±0,4	50±0	107	83	38
D-029	110±12%	34±4	0,34±0,08	13±0,7	653	101	37
D-030	95±11%	80±14	0,53±0,05	31±10	362	152	59
D-048	90±57	95±7	1,4±0,9	123±40	67	70	91
D-999*	62%	71%	75	90	2	2	1
LY294002*	23±5	3,7±2	2,1±1,5	29±13	11	2	13

* compuesto comparativo

EJEMPLO 12

Datos de ensayo basados en células para inhibidores de la actividad de PI3K δ

[0295] Usando los métodos descritos en los Ejemplos 3-5 anteriores, los compuestos de la invención se probaron para determinar la actividad inhibitoria y la potencia en ensayos de proliferación estimulada de células B y T, migración de neutrófilos (PMN) y liberación de elastasa de neutrófilos (PMN). Los datos de estos ensayos se exponen en la Tabla 4, a continuación. En la Tabla 4, los valores mostrados son concentraciones efectivas del compuesto (CE₅₀; μ M). Cuando no se proporciona ningún valor, no se realizó ningún ensayo.

35

40

45

50

55

60

Compuesto	Estim BCR de ratón (CE ₅₀)	Estim TCE de ratón (CE ₅₀)	Elastasa de PMN humano (CE ₅₀)	Migración de PMN humano (CE ₅₀)
D-000*	0,9±0,4	5,5±4	2,2±2	1-5
D-003	3,9	5,7		
D-005	0,7±0,1	3,9	4,3±1	
D-006	0,2±0,1	5,3	0,3±0,1	
D-007	0,3±0,1	4,2	0,4	
D-008	1,0			
D-009	0,3±0,2		10,5	
D-012	0,3±0,2		0,3	
D-029	0,1±0,3	3,4±2	0,5±0,6	0,3
D-030	0,1±0,1	6	0,4±0,5	0,2
D-048	0,4±0,2	5	0,9±0,2	
D-049	2,0	6,3	5,0	
D-999*	3,1±0,7	5,9	>20	1
LY294002*	0,9±0,5			

*compuesto comparativo

EJEMPLO 13

Ensayo de inhibidores de la actividad de PI3K δ en células cancerosas

[0296] El efecto de los compuestos de la invención sobre la proliferación de células cancerosas se evaluó probando uno de los compuestos contra un panel de líneas celulares de leucemia mieloide crónica (CML), que incluyen KU812, RWLeu4, K562 y MEG-01.

[0297] La actividad inhibidora del compuesto (D-000, disuelto en DMSO) se determinó como sigue. El compuesto probado se añadió en una serie de concentraciones (0,001 μM a 20 μM) a placas de microtitulación de 96 pocillos con células (1000 a 5000 células/pocillo). Las placas se incubaron durante cinco días a 37°C durante las cuales los cultivos de control sin compuesto de prueba pudieron experimentar al menos dos ciclos de división celular. El crecimiento celular se midió mediante la incorporación de [^3H]-timidina durante dieciocho horas añadidas en los días tres, cuatro y cinco. Las células se transfirieron a un filtro, se lavaron y se contó la radioactividad usando un contador beta Matrix 96 (Packard). El porcentaje de crecimiento celular se midió de la siguiente manera:

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

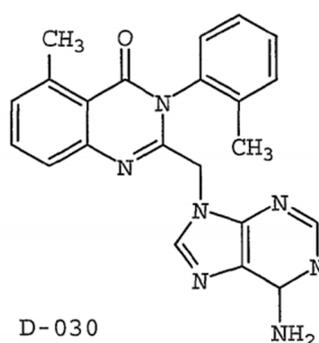
El valor de CE_{50} en estos experimentos se determinó por la concentración del compuesto de prueba que resultó en un recuento de radiactividad 50% más bajo que el obtenido usando el control sin inhibidor. El compuesto D-000 exhibió actividad inhibitoria con una CE_{50} de aproximadamente 2 μM para las líneas KU812 y RWLeu4. No se encontró que el compuesto exhibiera un efecto en las líneas K562 y MEG-01.

[0298] Los inhibidores de PI3K δ de la invención parecen inhibir el crecimiento celular de CML y, por lo tanto, podrían ser útiles en el tratamiento de tumores benignos o malignos. La expresión de PI3K δ se ha demostrado hasta ahora principalmente en células de origen hematopoyético. Sin embargo, podría estar presente en una variedad más amplia de células proliferantes. Por lo tanto, los compuestos de la invención podrían usarse para inducir la regresión tumoral y para prevenir la formación de metástasis tumoral tanto en leucemia como en tumor sólido o en la proliferación de origen no tumoral. Además, los compuestos podrían usarse tanto solos como en combinación con otros compuestos farmacológicamente activos o en combinación con radiación como agente sensibilizante.

EJEMPLO 14

Medición de la exocitosis de elastasa en lavado con bolsa de aire de ratón

[0299] Se probó el efecto de D-030 sobre la entrada de leucocitos y la exocitosis de elastasa de neutrófilos en modelos animales. El modelo de bolsa de aire de seis días es un modelo de inflamación *in vivo* que histológicamente se asemeja a una sinovial articular. Se desarrolla un revestimiento de células mononucleares organizadas y fibroblastos que se asemeja mucho a una cavidad sinovial. El modelo representa un modelo "agudo" de una enfermedad crónica (p. ej., artritis reumatoide). Este modelo permite la evaluación *in vivo* de agentes para bloquear el influjo celular en la bolsa de aire bajo la influencia de un estímulo inflamatorio.



[0300] La prueba se realizó de la siguiente manera: en el día cero, se afeitaron grupos de ratas y se inyectaron 10 ml de aire por vía subcutánea en la parte posterior de cada uno, formando una bolsa. El día tres, se reinyectaron 10 ml de aire. Seis horas antes del desafío con TNF en el día seis, un grupo de ratas (n = 6) recibió D-030 (100 mg/kg en el vehículo PEG 400) por vía oral, y otro grupo (n = 12) recibió el vehículo solo por vía oral. Seis horas después de la dosificación, las bolsas de aire de ambos grupos recibieron 2,5 ng de TNF. Doce horas después de la dosificación, las bolsas se lavaron con solución salina, y el líquido de lavado resultante se analizó para determinar los recuentos de

leucocitos y la actividad de elastasa de neutrófilos. Además, se extrajo sangre para determinar los niveles de D-030 en circulación. Los resultados fueron los siguientes: las ratas que recibieron D-030 durante doce horas tuvieron un promedio de 8,7 μM de compuesto en circulación y una reducción del 82% en los leucocitos totales en el fluido de lavado en comparación con los controles del vehículo. Las reducciones en los recuentos de leucocitos específicos fueron las siguientes: neutrófilos (90%), eosinófilos (66%) y linfocitos (70%). La cuantificación de la elastasa de neutrófilos mostró que las ratas tratadas con D-030 tenían niveles de elastasa algo reducidos (15%) en comparación con los controles del vehículo.

[0301] En otra prueba, se afeitó un área de la parte posterior del ratón con un cortaúñas, y se creó una bolsa de aire inyectando 3 ml de aire por vía subcutánea. En el día tres, se repitió la inyección de aire. El día seis, los animales recibieron dosis de D-030 (32 mg/kg en LABRAFIL[®]) o LABRAFIL[®] solo una hora antes y dos horas después del desafío con TNF- α (0,5 ng en 1 ml de PBS), o solo PBS. PBS es solución salina tamponada con fosfato. Cuatro horas después del desafío con TNF, los animales se anestesiaron y se lavaron las bolsas con 2 ml de solución salina al 0,9% con EDTA 2 mM. Los lavados se centrifugaron a 14.000 rpm en una microcentrífuga. Se usaron cincuenta microlitros del sobrenadante para medir la exocitosis de elastasa de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

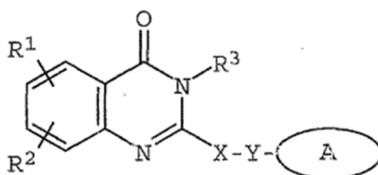
[0302] Como se muestra en la Figura 9, el desafío con TNF indujo un alto nivel de exocitosis de elastasa en comparación con los animales desafiados con PBS. Sin embargo, cuando los animales desafiados con TNF fueron tratados con D-030, se observó una disminución significativa en la actividad de elastasa en los lavados de bolsas de aire.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula estructural general

5

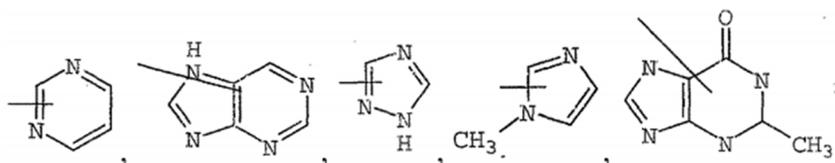
10



en donde el sistema de anillo A se selecciona del grupo que consiste en

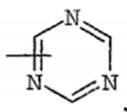
15

20



y

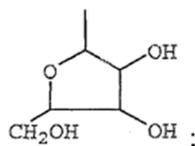
25



30

en donde el sistema de anillo A está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados del grupo que consiste de $N(R^a)_2$, halo, C_{1-3} alquilo, $S(C_{1-3}$ alquilo), OR^a y

35



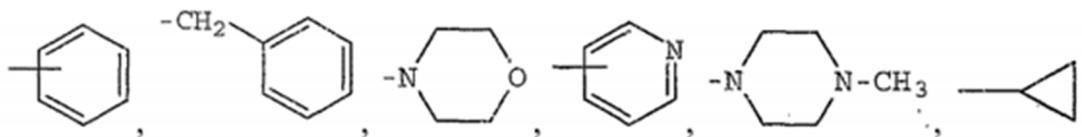
40

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

Y se selecciona del grupo que consiste en nulo y NH;

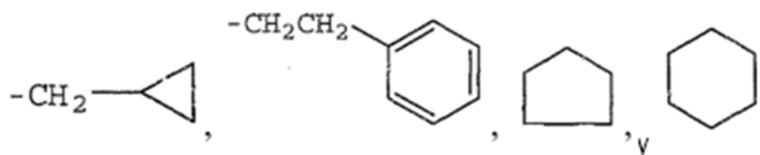
R^1 y R^2 , independientemente, se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, OR^a , halo, C_{1-6} alquilo, CF_3 , NO_2 , $N(R^a)_2$, NR^aC_{1-3} alquilenon(R^a)₂ y OC_{1-3} alquilenon(R^a)₂; R^3 se selecciona del grupo que consiste en

45



50

55



60

donde el grupo R^3 está opcionalmente sustituido con uno a tres sustituyentes seleccionados de halo, OR^a , C_{1-6} alquilo, arilo, heteroarilo, NO_2 , $N(R^a)_2$, $NR^aSO_2CF_3$, $NR^aC(=O)R^a$, $C(=O)OR^a$, $N(R^a)C_{1-4}$ alquilenon(R^a)₂, $SO_2N(R^a)_2$, CN, $C(=O)R^a$, alquilenon $C_{1-4}N(R^a)_2$ y alquilenon $OC_{1-4}N(R^a)_2$;

R^a se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, C_{1-6} alquilo, C_{3-8} cicloalquilo, C_{3-8} heterocicloalquilo, C_{1-3} alquilenon(R^a)₂, arilo, arilo C_{1-3} alquilo, C_{1-3} alquilenonarilo, heteroarilo, heteroarilo C_{1-3} alquilo, y C_{1-3} alquilenonheteroarilo;

65

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

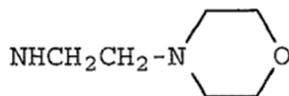
R^b se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, C₁₋₆ alquilo, arilo, heteroarilo, arilo, C₁₋₃alquilo, heteroarilo, C₁₋₃alquilo, C₁₋₃ alquilenarilo y alquileno C₁₋₃ heteroarilo; y sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de las mismas.

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

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde Y es NH.

10 **4.** El compuesto de la reivindicación 1, en el que R¹ y R² se seleccionan independientemente de H, OCH₃, Cl, Br, F, CH₃, CF₃, NO₂, OH, N(CH₃)₂,

15



y O (CH₂)₂OCH₂C₆H₅.

20 **5.** Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para la administración oral.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que está en forma de tabletas, píldoras, cápsulas, sellos, grageas, pastillas, líquidos, geles, jarabes, lodos, elixires, suspensiones o polvos.

25 **7.** La composición farmacéutica de la reivindicación 6, que está en forma de tabletas, grageas o cápsulas de gelatina.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, que contiene uno o más excipientes seleccionados del grupo que comprende:

30

- a) diluyentes, tales como azúcares, incluyendo lactosa, dextrosa, sacarosa, manitol o sorbitol;
- b) aglutinantes, tales como silicato de aluminio y magnesio, almidón de maíz, trigo, arroz o papa;
- c) materiales de celulosa, como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona, gomas, como goma arábiga y goma de tragacanto, y proteínas, como gelatina y colágeno;
- d) agentes desintegrantes o solubilizantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, almidones, agar, ácido algínico o una sal del mismo, 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) aromatizantes y edulcorantes;
- g) colorantes o pigmentos; y
- h) otros ingredientes, como conservantes, estabilizadores, agentes de hinchamiento, agentes emulsionantes, promotores de soluciones, sales para regular la presión osmótica y tampones.

40

45 **9.** La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en donde el compuesto está presente en una cantidad de 0,01 mg a 10.000 mg; o de 0,1 mg a 1.000 mg.

10. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 para uso en terapia.

50

55

60

65

FIGURA 1

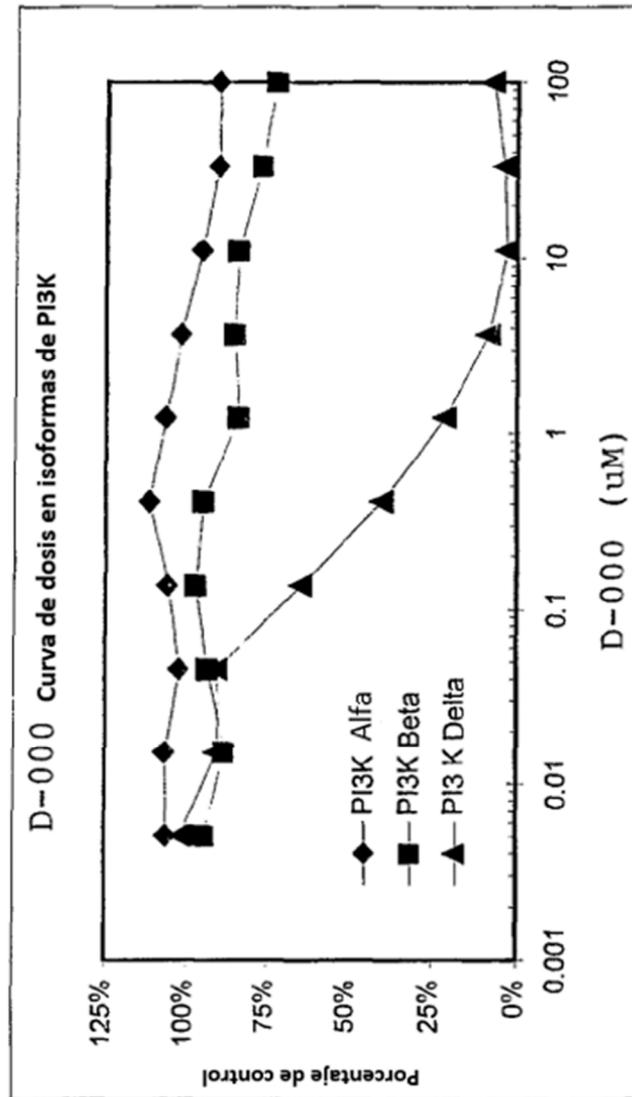


FIGURA 2

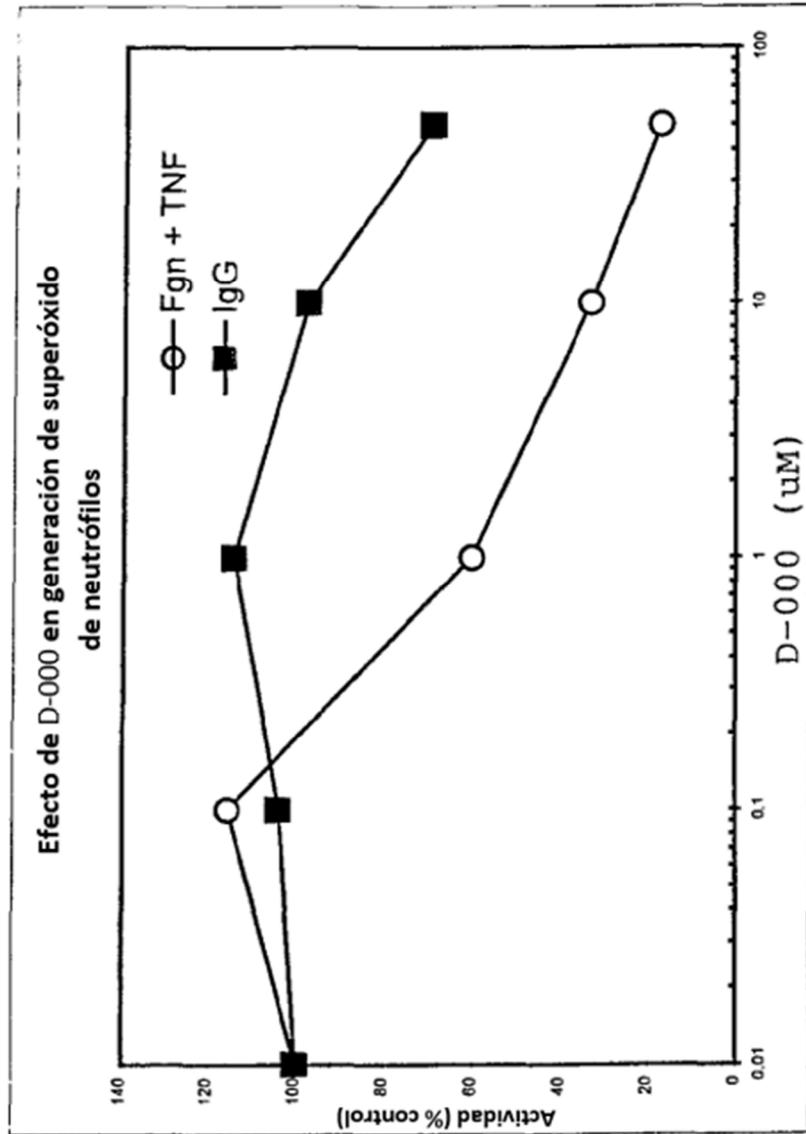


FIGURA 3

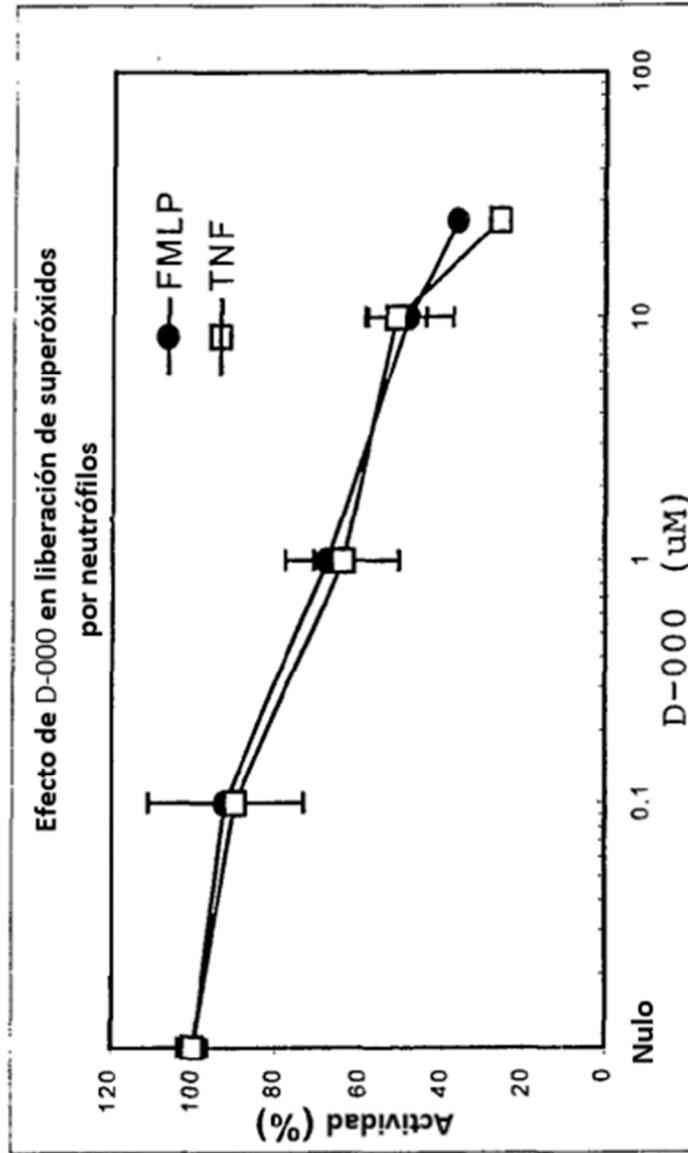


FIGURA 4

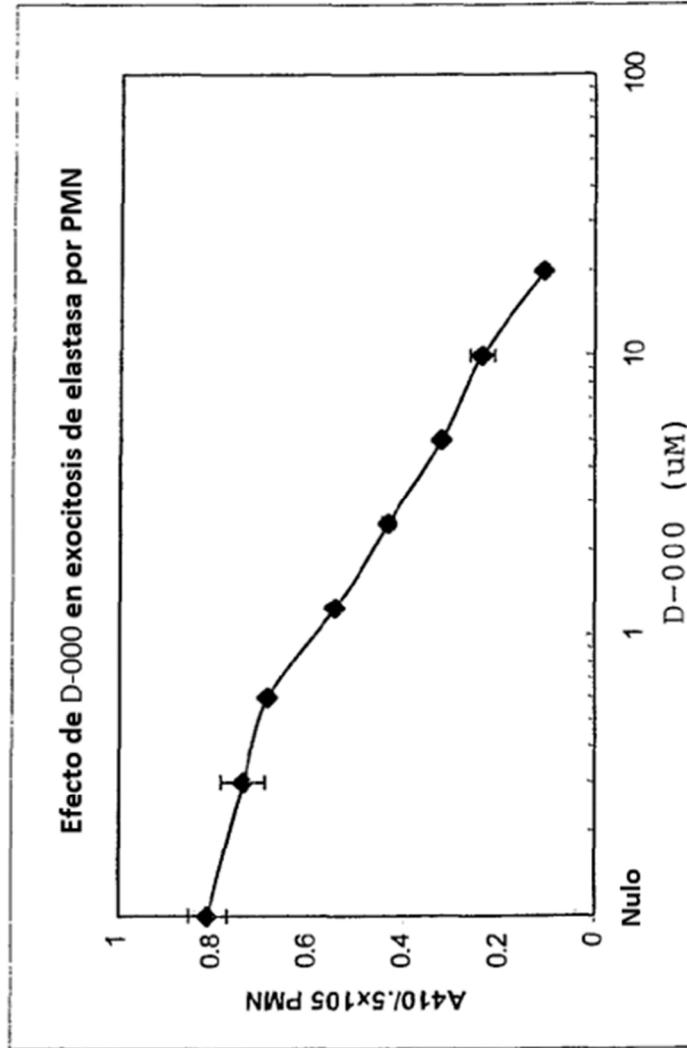


FIGURA 5

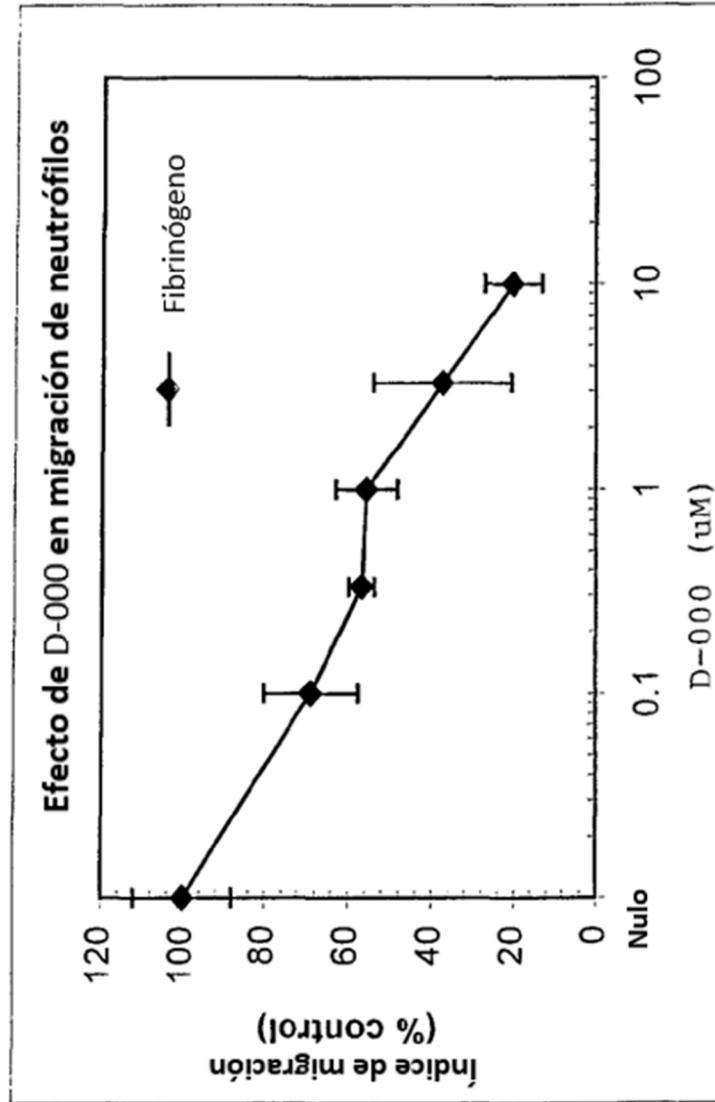


FIGURA 6

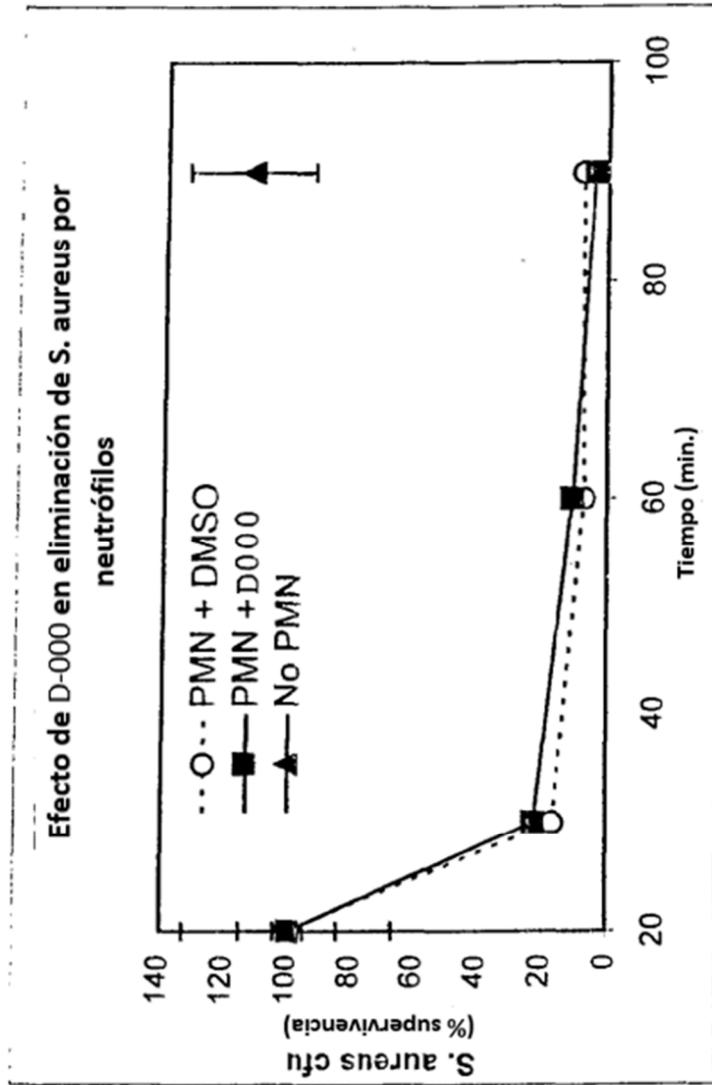


FIGURA 7

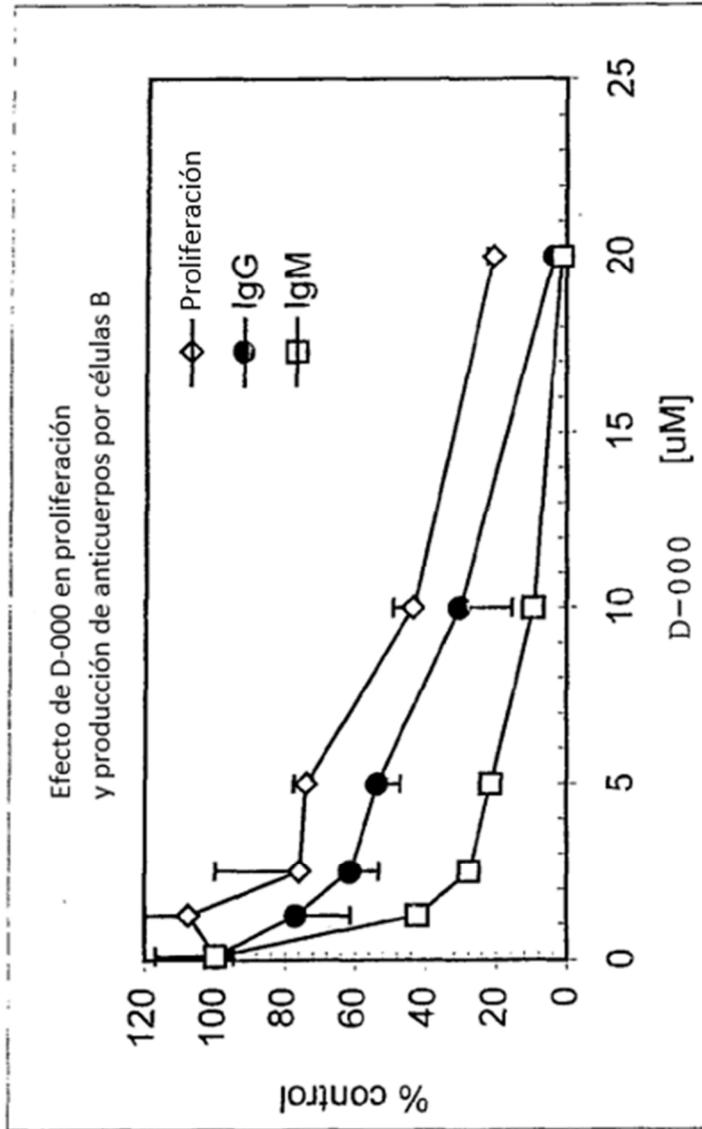
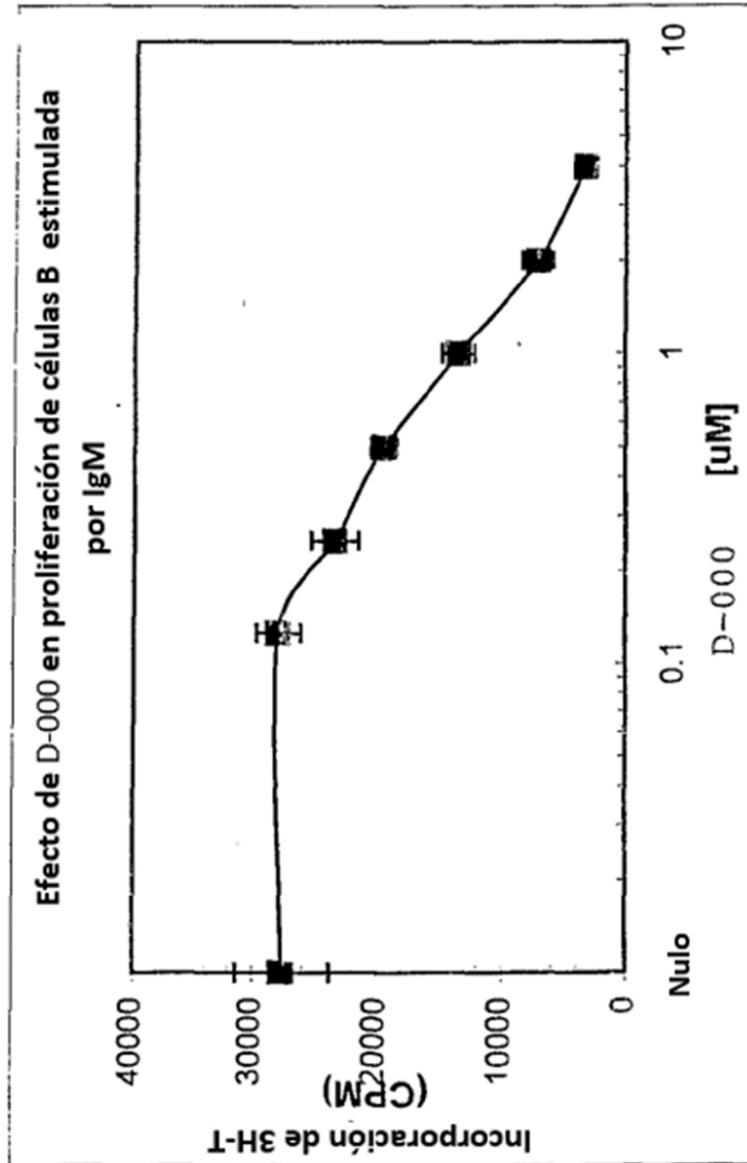


FIGURA 8



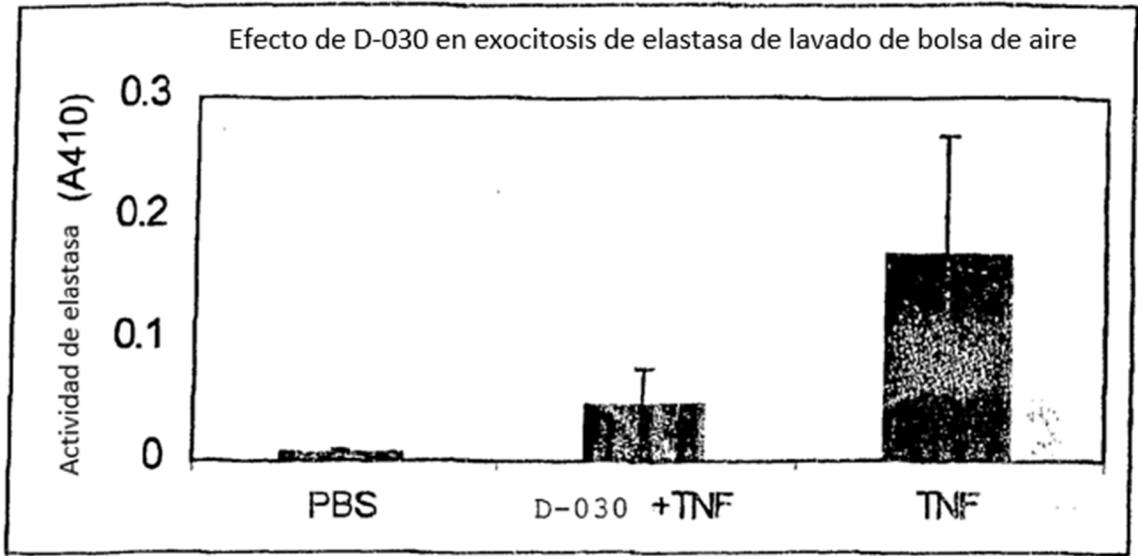


FIGURA 9