

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 820**

51 Int. Cl.:

C07D 413/14 (2006.01)

C07D 417/14 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2013 PCT/IB2013/060052**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2014 WO14072956**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2013 E 13795867 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2922848**

54 Título: **Derivados de oxazolidin-2-ona-pirimidina**

30 Prioridad:

12.11.2012 US 201261725113 P

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

14.11.2017

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FAIRHURST, ROBIN, ALEC;
FURET, PASCAL;
KALTHOFF, FRANK, STEPHAN, DR.;
LERCHNER, ANDREAS y
RUEEGER, HEINRICH**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 641 820 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

Derivados de oxazolidin-2-ona-pirimidina

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con compuestos de pirimidina oxazolidin-2-ona sustituidos que actúan como inhibidores de la PI3K (fosfatidilinositol-3-cinasa), así como también composiciones farmacéuticas de los mismos, métodos para su fabricación y usos para el tratamiento de condiciones, enfermedades y trastornos dependientes de cinasas PI3K.

Antecedentes de la invención

10 La superfamilia de fosfatidilinositol- 3- cinasas comprende cuatro diferentes cinasas de lípido o cinasas de proteína relacionadas con la PI3K. La clase I, II y III son cinasas de lípidos que difieren de sus especificidades de sustrato mientras que la PI3K clase IV también llamada cinasa de proteína relacionada con PI3-cinasa (PIKK) son cinasas de proteína. Las fosfatidilinositol- 3- cinasas Clase I constituyen una familia de cinasas de lípido que catalizan la transferencia de fosfato a la posición D- 3' de los lípidos de inositol para producir fosfoinositol- 3- fosfato (PIP), fosfoinositol- 3,4- difosfato (PIP₂) y fosfoinositol- 3,4,5- trifosfato (PIP₃) que, a su vez, actúan como segundos mensajeros en las cascadas de señalización mediante proteínas de anclaje que contienen dominios de homología de pleckstrin, FYVE, Phox y otros dominios de unión a fosfolípidos en una variedad de complejos de señalización a menudo en la membrana plasmática (Vanhaesebroeck, Annu Rev. Biochem 70:535 (2001)). La regulación aberrante de la PI3K, que a menudo aumenta la supervivencia y la proliferación a través de la activación de AKT cinasa es uno de los eventos más prevalentes en el cáncer humano y se ha demostrado que se produce en múltiples niveles (Liu et al., Nat. Rev. Drug Discov 8:627-644 (2009)). Por ejemplo, las mutaciones somáticas de cambio de sentido en PIK3CA que activan vías de señalización aguas abajo se han descrito en frecuencias significativas en una amplia diversidad de cánceres humanos (Huang et al., Science 318:1744-1748 (2007), Zhao y Vogt, Oncogene 27:5486 -5496 (2008)). El gen supresor tumoral *PTEN*, que desfosforila fosfoinosítidos en la posición 3' del anillo de inositol y al hacerlo antagoniza la actividad de PI3K, es funcionalmente mutado o suprimido en una variedad de tumores (Kenury & Parson, Oncogene 27:5477-5485(2008)). Algunos estudios indican que la falla de expresar *PTEN* puede mediar un cambio de dependencia de señalización desde la PI3K α a la isoforma β (Wee et al, Proc Natl Acad Sci USA 105:13057-13062 (2008)). Por lo tanto, la inhibición de ambas isoformas α y β PI3K de clase I pueden ser particularmente ventajosas en los cánceres que son deficientes en la fosfatasa *PTEN*.

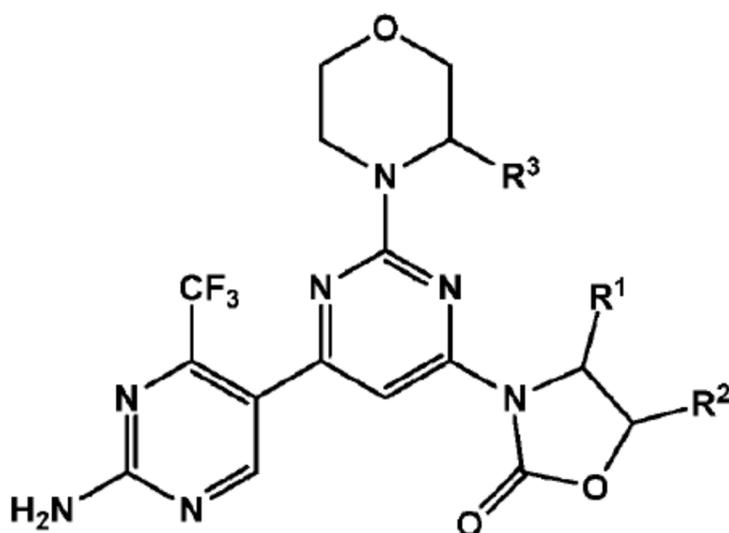
30 La solicitud de patente internacional publicada WO2007/084786 describe moléculas de pirimidina sustituidas que inhiben PI3K.

35 Está bien establecido que la activación de Akt resulta en la estimulación de la actividad de la cinasa del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR). mTOR es una proteína cinasa y un miembro de la PI3K clase IV. En células mamíferas, mTOR se encuentra formando complejos de dos entidades distintas denominadas mTORC1 y mTORC2. La activación de mTORC1 depende de las cinasas PI3K y Akt activas. La regulación de la activación de mTORC2 es más compleja. mTORC2 es responsable de la mejora de la actividad de Akt cinasa a través de fosforilación del residuo de serina 473 (Sarbasov et al., Science 307:1098-1101 (2005), Bayascas y Alessi, Mol Cell 18 (2) :143-145 (2005)). Por lo tanto, la inhibición catalítica de las isoformas PI3K clase I simultáneamente con la inhibición de mTOR podría representar un beneficio adicional, introduciendo potencialmente un efecto más fuerte sobre la vía PI3K-Akt.

40 Carcinoma de células escamosas cutáneo (SCC) representa el segundo cáncer más frecuente con la piel humana, comúnmente precedido por la queratosis actínica (AK). La patogénesis de la AK y SCC cutáneo se ha asociado con la exposición UV crónica como un factor de riesgo importante (Salasche, J Am Acad Dermatol 42:4-7 (2000)). Un aumento de la actividad de la ruta PI3K/Akt/mTOR se ha sugerido en un estudio previo (Chenet, Br J Dermatol; 160 (2) :442-445 (2009)). Se ha demostrado que la irradiación UV-B prolongada provoca una regulación a la baja de la expresión de *PTEN* en el ARNm y nivel proteico en queratinocitos humanos in vitro, promoviendo su supervivencia y crecimiento (Minget otros, Oncogene; 29 (4) :492-502 (2010)). Basado en la literatura reciente, existe una relación de causalidad entre la irradiación UV crónica y la regulación a la baja de *PTEN* (Daridoet al, Cancer Cell,. 20 (5): 635-648 (2011)). Por lo tanto, SCC cutáneo y AK y la piel dañada crónicamente por el sol todo puede estar asociado con una deficiencia de la expresión de *PTEN* que conduce a una activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.

Resumen de la invención

50 La invención se refiere a compuestos de pirimidina oxazolidin-2-ona sustituidos de la fórmula (I) y/o sales farmacéuticamente aceptables y/o solvatos de los mismos,



(I)

en donde,

R¹ es metilo, etilo o hidroximetilo;

5 R² es fenilo, que está sin sustituir o sustituido en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de D, F o metoxi para la posición meta y a partir de D, F, metoxi, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxi-C₂-C₄-alcoxilo o C₁-C₂-alcoxi-C₂-C₄-alcoxilo para la posición para,

o

10 piridilo, que está sin sustituir o sustituido en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de D, F o metoxi para la posición meta y a partir de D, F, metoxi, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxi-C₂-C₄-alcoxilo o C₁-C₂-alcoxi-C₂-C₄-alcoxilo para la posición para,

o

un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene de 2 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, o S, que está no sustituido o sustituido con 1 a 2 sustituyentes seleccionados independientemente a partir de D o F;

y

15 R³ es H o metilo.

A menos que se especifique lo contrario, el término "compuestos de la presente invención" se refiere a compuestos de la fórmula (I) y subfórmulas de los mismos; sales del compuesto, hidratos o solvatos de los compuestos y/o sales; así como también todos los estereoisómeros (incluyendo diaestereoisómeros), tautómeros y compuestos isotópicamente marcados (incluyendo sustituciones de deuterio). Los compuestos de la presente invención comprenden además polimorfos de los compuestos de la fórmula (I) (o subfórmulas de los mismos) y sus sales. Cuando se mencionan compuestos de fórmula (I), esta se entiende que incluye también los tautómeros y N-óxidos de los compuestos de fórmula (I).

25 Los compuestos de la fórmula (I) se consideran adecuados para ser utilizados en el tratamiento de enfermedades dependientes de cinasas de PI3. Los compuestos de fórmula (I) se consideran adecuados, por ejemplo, para ser utilizados en el tratamiento de enfermedades dependientes de la cinasa PI3 clase I o dependientes de la cinasa PI3 clase I y mTOR.

Descripción detallada de la invención

30 La invención puede ser completamente apreciada como referencia a la siguiente descripción incluyendo el siguiente glosario de términos y los ejemplos finales. Como se utilizan en la presente, los términos "que incluye", "que contiene" y "que comprende" se utilizan en la presente en su sentido abierto no limitativo.

Los términos generales usados anteriormente y en adelante tienen preferiblemente dentro del contexto de esta descripción los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:

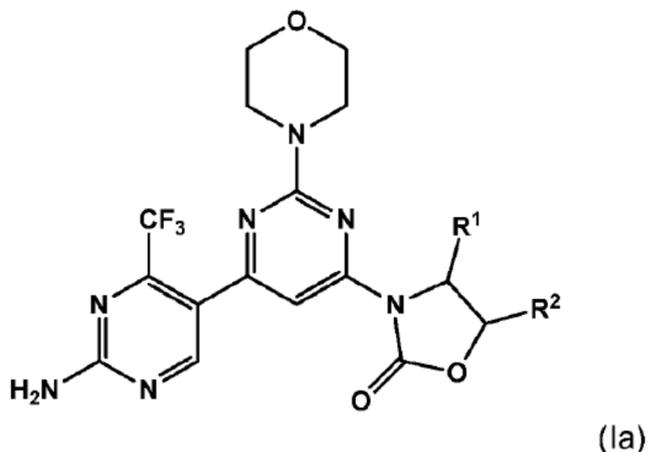
5 Como se usa en este documento, el término "alcoxilo" se refiere a una fracción de alquilo totalmente saturado ramificado, que incluye una fracción de hidrocarburo simple o múltiple, o fracción de hidrocarburo no ramificado unido al resto de la molécula a través de un grupo de unión -O-. A menos se disponga otra cosa, alcoxilo se refiere a fracciones que tienen 1 a 16 átomos de carbono, de 1 a 10 átomos de carbono, 1 a 7 átomos de carbono, o 1 a 4 átomos de carbono. Ejemplos de alcoxilo incluyen, pero no se limitan a, metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, iso-propoxilo, n-butoxilo, sec-butoxilo, iso-butoxilo, ter-butoxilo, n-pentoxilo, isopentoxilo, neopentilo, n-hexiloxilo.

Como se utiliza en la presente, el término "piridilo" se refiere a 2-piridilo, 3-piridilo o 4-piridilo. Sustituyentes en la posición meta o para están fijado a un átomo de carbono del piridilo. Un ejemplo representativo es 3-piridilo

10 Como se usa en este documento, para los sustituyentes en heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene de 2 a 3 heteroátomos seleccionados de N, O, o S están unidos a un átomo de carbono del heteroarilo. Ejemplos de heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contienen 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S incluyen, pero no se limitan a tiazolilo, oxazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,3,4-oxadiazolilo y 1,3,4-tiadiazolilo. Un ejemplo representativo es tiazolilo.

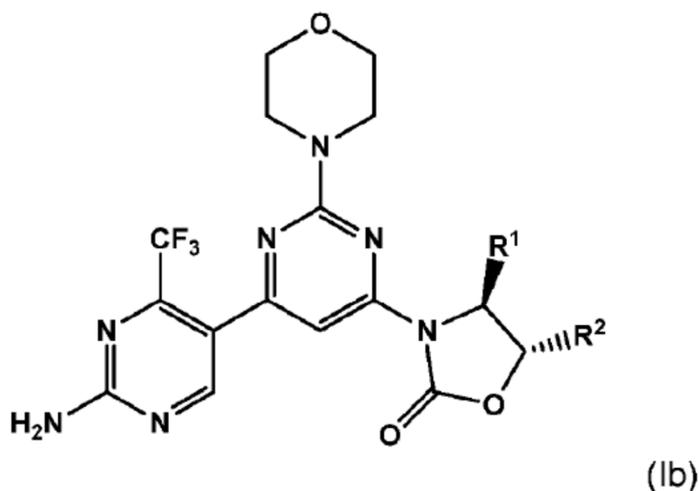
15 Varias realizaciones de la invención se describen en la presente. Se reconocerá que las características especificadas en cada realización pueden combinarse con otras características especificadas para proporcionar realizaciones adicionales de la presente invención.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, seleccionado a partir de un compuesto de la fórmula (Ia)



20 en donde R¹ y R² son como se definen para un compuesto de la fórmula (I) anterior.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de la fórmula (I) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, seleccionado a partir de un compuesto de la fórmula (Ib)



en donde R¹ y R² son como se definen para un compuesto de la fórmula (I) anterior.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

5 R^2 es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄-alcoxilo o C₁- C₂-alcoxi- C₂- C₄-alcoxilo para la posición para.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

10 R^2 es piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄-alcoxilo o C₁- C₂-alcoxi- C₂- C₄-alcoxilo para la posición para.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

15 En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es fenilo, 3- metoxi-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 4- (3- hidroxipropoxi)- fenilo, 4- (2- hidroxietoxi)- fenilo o 4- (2- metoxioetoxi)- fenilo.

20 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es 3- piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄-alcoxilo o C₁- C₂-alcoxi- C₂- C₄-alcoxilo para la posición para.

25 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es 3- piridilo.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

30 R^2 es tiazolilo, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es 2- tiazolilo que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

35 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^2 es 2- tiazolilo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

40 R^1 es metilo.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^1 es etilo.

45 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (I), (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R^1 es hidroximetilo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es metilo;

5 R² es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxi-C₂-C₄-alcoxilo o C₁-C₂-alcoxi-C₂-C₄-alcoxilo para la posición para.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es metilo;

10 R² es piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxi-C₂-C₄-alcoxilo o C₁-C₂-alcoxi-C₂-C₄-alcoxilo para la posición para.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

15 R¹ es metilo;

R² es un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F;.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

20 R¹ es metilo;

R² es fenilo, 3- metoxi-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 4- (3- hidroxipropoxi)- fenilo, 4- (2- hidroxietoxi)- fenilo o 4- (2- metoxiloetoxi)- fenilo.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

25 R¹ es metilo;

R² es 3- piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅-alcoxilo, hidroxi-C₂-C₄-alcoxilo o C₁-C₂-alcoxi-C₂-C₄-alcoxi para la posición para.

30 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es metilo;

R² es 3- piridilo.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

35 R¹ es metilo;

R² es tiazolilo, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

40 R¹ es metilo;

R² es 2- tiazolilo que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F;.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

45 R¹ es metilo;

R² es 2- tiazolilo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

- 5 R² es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

- 10 R¹ es etilo;

R² es piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

- 15 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

- 20 En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es fenilo, 3- metoxi-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 4- (3- hidroxipropoxi)- fenilo, 4- (2- hidroxietoxi)- fenilo o 4- (2- metoxietoxi)- fenilo.

- 25 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es 3- piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

- 30 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es 3- piridilo.

- 35 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es tiazolilo, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

- 40 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es 2- tiazolilo que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

- 45 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es etilo;

R² es 2- tiazolilo.

En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

5 R¹ es hidroximetilo;

R² es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxi- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxi para la posición para.

10 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxi- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

15 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

20 En una realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es fenilo, 3- metoxi-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 4- (3- hidroxipropoxi)- fenilo, 4- (2- hidroxietoxi)- fenilo o 4- (2- metoxiloetoxi)- fenilo.

25 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es 3- piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, metoxilo, C₁-C₅- alcoxilo, hidroxi- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

30 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es 3- piridilo.

35 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es tiazolilo, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

40 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es 2- tiazolilo que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

45 En otra realización, la invención proporciona un compuesto de las fórmulas (Ia) o (Ib) y/o una sal farmacéuticamente

aceptable y/o un solvato del mismo, en donde

R¹ es hidroximetilo;

R² es 2- tiazolilo.

- 5 En otra realización, la invención proporciona un compuesto y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, seleccionado a partir de
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil-5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- 10 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil-5- feniloxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- metil-5- feniloxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (3- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (tiazol- 2- il)oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- etil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona,
- 15 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- hidroximetil-5- fenil- oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- (2- metoxiloetoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona,
- 20 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 5- (4- (2- hidroxietoxi)fenil)- 4- (hidroximetil)oxazolidin- 2- ona o
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- (3- hidroxipropoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona.
- 25 En otra realización, la invención proporciona un compuesto y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o un solvato del mismo, seleccionado a partir de
- (4S,5R)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona,
- (4S*,5S*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- 30 (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- (4S*,5R*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- feniloxazolidin- 2- ona,
- (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- metil-5- feniloxazolidin- 2- ona,
- 35 (4R*,5R*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (3- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona,
- (4S,5R)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (tiazol- 2- il)oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- etil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona,
- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona,
- 40 (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- hidroximetil-5- fenil- oxazolidin- 2- ona,
- (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4- il- 4'- trifluorometil-[4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil-5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona,

(4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bupirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- (2- metoxiloetoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona,

(4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bupirimidin]- 6- il)- 5- (4- (2- hidroxietoxi)fenil)- 4- (hidroximetil)oxazolidin- 2- ona o

5 (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bupirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- (3- hidroxipropoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona.

Realizaciones específicas están proporcionadas por compuestos ejemplificados específicos.

10 Como se utiliza en la presente, el término "un isómero óptico" o "un estereoisómero" se refiere a cualquiera de las diferentes configuraciones estereoisoméricas que pueden existir para un compuesto dado de la presente invención e incluye isómeros geométricos. Se entiende que un sustituyente será fijado a un centro quiral de un átomo de carbono. El término "quiral" se refiere a moléculas que tienen la propiedad de no poder ser superpuestas sobre su imagen especular, mientras que el término "aquiral" se refiere a las moléculas que son superpuestas sobre su imagen especular. Por lo tanto, la invención incluye enantiómeros, diastereoisómeros o racematos del compuesto. Los "enantiómeros" son un par de estereoisómeros que son imágenes especulares que no pueden ser superpuestas entre sí. Una mezcla 1:1 de un par de enantiómeros es una mezcla "racémica". El término se utiliza para designar una mezcla racémica donde sea apropiado.

20 Los "diaestereoisómeros" son estereoisómeros que tienen al menos dos átomos asimétricos, pero los cuales no son imágenes especulares entre sí. La estereoquímica absoluta es especificada de acuerdo con el sistema R-S de Cahn-Ingold- Prelog. Cuando un compuesto es un enantiómero puro la estereoquímica de cada carbono quiral puede especificarse por cualquiera R o S. Compuestos resueltos cuya configuración absoluta se desconoce pueden designarse (+) o (-) dependiendo de la dirección (dextro- o levorotatoria) que rotan el plano de luz polarizada de acuerdo con la longitud de onda de la línea D del sodio. Ciertos compuestos descritos la presente contienen uno o más centros asimétricos o ejes y pueden así dar origen a enantiómeros, diastereoisómeros, y otras formas estereoisoméricas que serán definidas, en términos de la estereoquímica absoluta, como (R)- o (S)-.

25 Dependiendo de la elección de los materiales de inicio y los procedimientos, los compuestos pueden estar presentes en la forma de uno de los posibles isómeros o como mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros ópticos puros, o como mezclas de isómeros, tales como racematos y mezclas de diastereoisómeros, en función del número de átomos de carbono asimétricos. La presente invención se entiende incluye todos los isómeros posibles, incluyendo mezclas racémicas, mezclas diastereoisoméricas y formas ópticamente puras. Isómeros ópticamente activos (R)- y (S)- pueden prepararse utilizando sintones quirales o reactivos quirales, o resolverse utilizando técnicas convencionales. Si el compuesto contiene un enlace doble, el sustituyente puede ser de configuración E o Z. Si el compuesto contiene un cicloalquilo disustituido, el sustituyente cicloalquilo puede tener una configuración cis- o - trans. Todas las formas tautoméricas también son incluidas.

35 Como se utiliza en la presente, los términos "sal" o "sales" se refieren a una sal de adición de ácido o adición de álcali de un compuesto de la invención. "Sales" incluyen en particular "sales farmacéuticamente aceptables". El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que retienen la efectividad biológica y propiedades de los compuestos de esta invención y, que típicamente son biológicamente o de otra manera deseables. En muchos casos, los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales ácidas y/o alcalinas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares de los mismos.

40 Sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden formarse con ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, por ejemplo, acetato, aspartato, benzoato, besilato, bromuro/bromhidrato, bicarbonato/carbonato, bisulfato/sulfato, alcanforsulfonato, cloruro/chlorhidrato, clorteofilonato, citrato, etanodisulfonato, fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hipurato, yodhidrato/yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, metilsulfato, naftoato, napsilato, nicotinato, nitrato, octadecanoato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, fosfato/fosfato ácido/fosfato diácido, poligalacturonato, propionato, estearato, succinato, sulfosalicilato, tartrato, tosilato y sales de trifluoroacetato.

Ácidos inorgánicos a partir de los cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares.

50 Ácidos orgánicos de tales sales pueden derivarse incluyendo, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido toluensulfónico, ácido sulfosalicílico, y similares. Las sales de adición de álcali farmacéuticamente aceptables pueden formarse con bases inorgánicas y orgánicas.

55 Bases inorgánicas a partir de las cuales las sales pueden derivarse incluyen, por ejemplo, sales y metales de amonio de las columnas I a XII de la Tabla Periódica. En ciertas realizaciones, las sales se derivan a partir de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, plata, zinc, y cobre; sales particularmente apropiadas incluyen sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.

Bases orgánicas a partir de las cuales pueden derivarse las sales incluyen, por ejemplo, aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de ocurrencia natural, aminas cíclicas, resinas de intercambio de iones alcalinos, y similares. Ciertas aminas orgánicas incluyen isopropilamina, benzatina, colinato, dietanolamina, dietilamina, lisina, meglumina, piperazina y trometamina.

5 Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir de una fracción alcalina o ácida, mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden prepararse al reaccionar formas ácidas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tales como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg, o K o similares), o al reaccionar formas alcalinas libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Típicamente, tales reacciones se realizan en agua
10 o en un solvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Generalmente, el uso de medios no acuosos tipo éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol, o acetonitrilo es deseable, donde pueda realizarse. Listas de sales apropiadas adicionales pueden encontrarse, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); y en "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" de Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

15 A menos que se indique lo contrario, cualquiera fórmula dada en la presente también tiene el propósito de representar formas no marcadas así como también formas isotópicamente marcadas de los compuestos. Los compuestos isotópicamente marcados tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en la presente excepto que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene un número de masa o masa atómica seleccionados. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono,
20 nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor, y cloro, tales como ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I respectivamente. La invención incluye diferentes compuestos isotópicamente marcados como se definen en la presente, por ejemplo aquellos en los cuales isótopos radioactivos, tales como ^3H , y ^{14}C , o aquellos en los cuales isótopos no radioactivos, tales como ^2H y ^{13}C están presentes. Tales compuestos marcados isotópicamente son útiles en estudios metabólicos (con ^{14}C), estudios cinéticos de reacción (con, por ejemplo ^2H o ^3H), técnicas de detección o
25 visualización, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT) incluyen ensayo de distribución tisular de sustratos o fármacos, o tratamientos radioactivos de pacientes. En particular, un ^{18}F o un compuesto marcado pueden ser particularmente deseados para estudios PET o SPECT. Los compuestos isotópicamente marcados de la fórmula (I) pueden generalmente prepararse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a aquellos descritos en los Ejemplos y Preparaciones anexos utilizando un reactivo isotópicamente marcado apropiado en cambio
30 del reactivo no marcado previamente empleado.

Además, la sustitución con isótopos más pesados, particularmente deuterio (es decir, ^2H o D) puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan a partir de la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo vida media *in vivo* aumentada o requerimientos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que deuterio
35 en este contexto es considerado como un sustituyente de un compuesto de la fórmula (I). La concentración de tal isótopo más pesado, específicamente deuterio, será definida por el factor de enriquecimiento isotópico. El término "factor de enriquecimiento isotópico" como se utiliza en la presente se refiere a la relación entre la abundancia isotópica y la abundancia natural de un isótopo específico. Si un sustituyente en un compuesto de esta invención se denota deuterio, tal compuesto tiene un factor de enriquecimiento isotópico para cada átomo de deuterio designado de al
40 menos 3500 (52.5% de incorporación de deuterio en cada átomo de deuterio designado), al menos 4000 (60% de incorporación de deuterio), al menos 4500 (67.5% de incorporación de deuterio), al menos 5000 (75% de incorporación de deuterio), al menos 5500 (82.5% de incorporación de deuterio), al menos 6000 (90% de incorporación de deuterio), al menos 6333.3 (95% de incorporación de deuterio), al menos 6466.7 (97% de incorporación de deuterio), al menos 6600 (99% de incorporación de deuterio), o al menos 6633.3 (99.5% de incorporación de deuterio).

45 Solvatos farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención incluyen aquellos en donde el solvente de cristalización puede sustituirse isotópicamente, por ejemplo D_2O , d_6 -acetona, d_6 -DMSO.

Los compuestos de la invención, es decir, los compuestos de la fórmula (I) que contienen grupos capaces de actuar como donantes y/o aceptores de enlaces de hidrógeno pueden ser capaces de formar co-cristales con formadores de
50 co-cristales adecuados. Estos co-cristales pueden prepararse de compuestos de la fórmula (I) mediante procedimientos de formación de cocrystalos conocidos. Tales procedimientos incluyen trituración, calentamiento, co-sublimación, co-fundición, o poner en contacto en solución compuestos de la fórmula (I) con el formador de co-cristales bajo condiciones de cristalización y aislamiento de co-cristales así formados. Formadores de co-cristales apropiados incluyen aquellos descritos en WO 2004/078163. Por lo tanto la invención además proporciona co-cristales que comprenden un compuesto de la fórmula (I).

55 Como se utiliza en la presente, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes tensoactivos, antioxidantes, conservadores (ej., agentes antibacterianos, agentes antimicóticos), agentes isotónicos, agentes retardantes de absorción, sales, conservadores, estabilizadores de fármaco, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, edulcorantes, agentes
60 saborizantes, colorantes, y similares y combinaciones de los mismos, como se conocerá por aquellos con experiencia en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289- 1329). Excepto en lo que respecta a cualquier vehículo convencional incompatible con el ingrediente

activo, su uso es contemplado en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

El término "una cantidad terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la presente invención se refiere a una cantidad del compuesto de la presente invención que producirá la respuesta biológica o médica de un sujeto, por ejemplo, reducción o inhibición de una enzima o una actividad proteica, o mejorar síntomas, aliviar condiciones, retardar la progresión de la enfermedad, o prevenir una enfermedad, etc. En una realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es efectiva para (1) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una condición, o un trastorno o una enfermedad (i) mediada por la cinasa IP3 clase I, o (ii) asociada con actividad de la cinasa PI3 clase I, o (iii) caracterizada por actividad (normal o anormal) de la cinasa PI3 clase I; o (2) reducir o inhibir la actividad de la cinasa PI-3 clase I. En otra realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a una célula, tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es eficaz, al menos parcialmente para reducir o inhibir la actividad de la cinasa PI3 clase I.

En otra realización, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a un sujeto, es eficaz para (1) al menos parcialmente aliviar, inhibir, prevenir y/o mejorar una condición, o un trastorno o una enfermedad (i) mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR y, o (ii) asociado con la cinasa PI3 clase I y la actividad de mTOR, o (iii) que se caracteriza por la actividad (normal o anormal) de la cinasa PI3 clase I y mTOR, o (2) reducir o inhibir la actividad de la cinasa PI3 clase I y mTOR. En otra realización no limitante, el término "una cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del compuesto de la presente invención que, cuando se administra a una célula o tejido, o un material biológico no celular, o un medio, es eficaz al menos parcialmente, para reducir o inhibir la actividad de la cinasa PI3K Clase I y/o mTOR.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" se refiere a un animal. Típicamente el animal es un mamífero. Un sujeto también se refiere a por ejemplo, primates (*ej.*, humanos, hombres o mujeres), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, ratas, ratones, peces, aves y similares. En ciertas realizaciones, el sujeto es un primate. En aún otras realizaciones, el sujeto es un humano.

Como se utiliza en la presente, el término "inhibir" o "inhibición" se refiere a la reducción o supresión de una condición, síntoma, o trastorno, o enfermedad dada, o una disminución significativa en la actividad inicial de una actividad o proceso biológico.

Como se utiliza en la presente, el término "tratar", o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere en una realización, a mejorar la enfermedad o trastorno (es decir, retardar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de la misma). En otra realización "tratar" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico incluyendo aquellos los cuales pueden ser no discernibles por el paciente. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, bien sea físicamente, (*ej.*, estabilización de un síntoma discernible), fisiológicamente (*ej.*, estabilización de un parámetro físico), o ambos. En aún otra realización, "tratar" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retardar el comienzo o desarrollo o progresión de la enfermedad o trastorno.

Como se utiliza en la presente, un sujeto está "en necesidad de" un tratamiento si tal sujeto se beneficia biológicamente, médicamente o mejora su calidad de vida a partir de tal tratamiento.

Como se utiliza en la presente, el término "un," "una," "el", "los" y términos similares se utilizan en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) para cubrir formas tanto singulares como plurales a menos que se indique lo contrario o claramente sea contradicho por el contexto.

Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.*, "tal como") proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor la invención y no implica limitación sobre el alcance de la invención de otra manera reivindicado.

Cualquier átomo asimétrico (*ej.*, carbono o similares) de los compuestos de la presente invención puede presentarse en la configuración racémica o enantioméricamente enriquecida, por ejemplo la configuración (R)-, (S)- o (R,S)-. En ciertas realizaciones, cada átomo asimétrico tiene al menos 50% de exceso enantiomérico, al menos 60 % de exceso enantiomérico, al menos 70 % de exceso enantiomérico, al menos 80 % de exceso enantiomérico, al menos 90 % de exceso enantiomérico, al menos 95 % de exceso enantiomérico, o al menos 99 % de exceso enantiomérico en la configuración (R)- o (S)-. Los sustituyentes en átomos con enlaces no saturados pueden, si es posible, estar presentes en la forma *cis*- (Z)- o *trans*- (E)-.

En consecuencia, como se utiliza en la presente un compuesto de la presente invención puede estar en la forma de uno de los posibles isómeros, rotámeros, atropisómeros, tautómeros o mezclas de los mismos, por ejemplo, como isómeros geométricos sustancialmente puros (*cis* o *trans*), diastereómeros, isómeros ópticos (antípodos), racematos o mezclas de los mismos.

Cualquier mezcla resultante de isómeros puede ser separada sobre la base de las diferencias fisicoquímicas de los

constituyentes, en isómeros geométricos u ópticos puros o sustancialmente puros, diastereoisómeros, racematos, por ejemplo, mediante cromatografía y/o cristalización fraccional.

5 Cualesquier racematos resultantes de los productos finales o intermediarios pueden ser resueltos en los antípodos ópticos mediante métodos conocidos, por ejemplo, mediante separación de las sales diastereoisoméricas de los mismos, obtenidas con un ácido o base óptimamente activos, y liberando el compuesto ácido o alcalino ópticamente activo. En particular, una fracción alcalina puede emplearse para separar los compuestos de la presente invención en sus antípodos ópticos, por ejemplo, mediante cristalización fraccional de una sal formada con un ácido ópticamente activo, por ejemplo, ácido tartárico, ácido dibenzoil tartárico, ácido diacetil tartárico, ácido di-O,O'-*p*-toluoil tartárico, ácido mandélico, ácido málico o ácido alcanfor-10-sulfónico. Los productos racémicos también pueden separarse
10 mediante cromatografía quiral, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un absorbente quiral.

Además, los compuestos de la presente invención, incluyendo sus sales, también pueden obtenerse en la forma de sus hidratos, o incluir otros solvatos utilizados para su cristalización. Los compuestos de la presente invención pueden inherentemente o por diseño formar solvatos con solvatos farmacéuticamente aceptables (incluyendo agua); por lo tanto, se pretende que la invención incluya formas tanto solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se refiere a un complejo molecular de un compuesto de la presente invención (incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de los mismos) con una o más moléculas solventes. Tales moléculas solventes son aquellas comúnmente utilizadas en el estado de la técnica farmacéutica, las cuales son conocidas por ser inocuas para el receptor, por ejemplo, agua, etanol, y similares. El término "hidrato" se refiere al complejo donde la molécula solvente es agua.

20 Los compuestos de la presente invención, incluyendo sales, hidratos y solvatos de los mismos, pueden inherentemente o por diseño formar polimorfos.

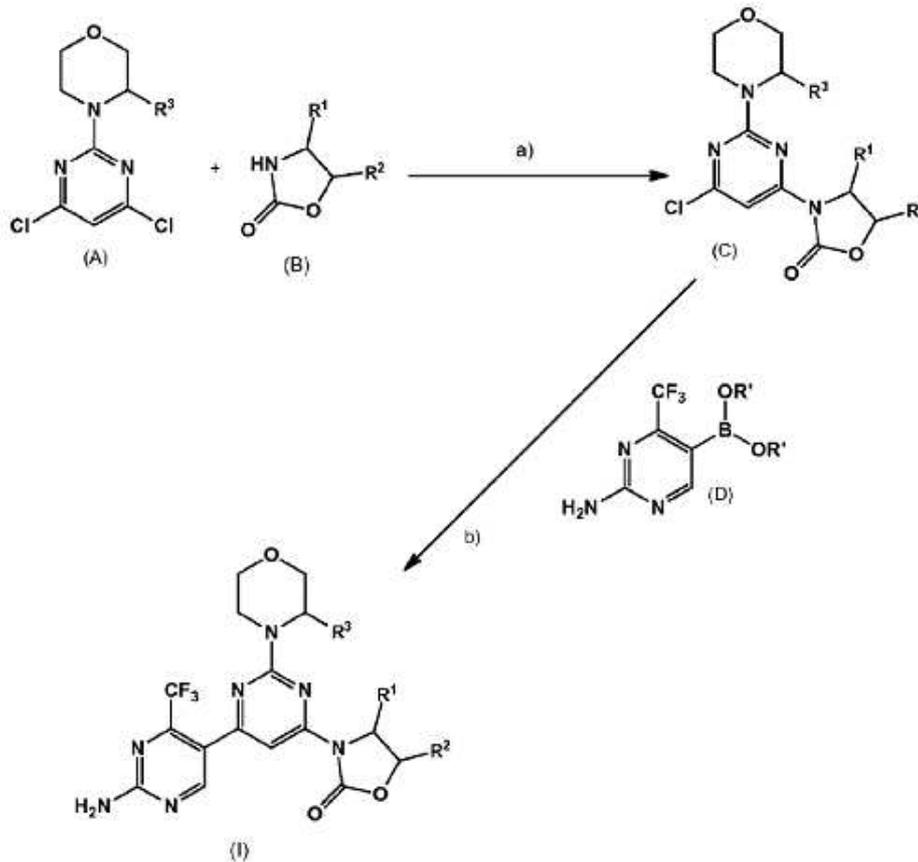
Los compuestos de la presente invención pueden sintetizarse mediante rutas sintéticas que incluyen procesos análogos a aquellos bien conocidos en las artes químicas, particularmente a la luz de la descripción contenida en la presente. Los materiales de inicio generalmente están disponibles de fuentes comerciales o se pueden preparar fácilmente utilizando métodos bien conocidos por aquellos con experiencia en el estado de la técnica (ej., preparados mediante métodos generalmente descritos en Louis F. Fieser y Mary Fieser, *Reactivos para Síntesis Orgánica*, v. 1-19, Wiley, New York (1967-1999 ed.), o Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin, que incluyen suplementos (también disponibles vía la base de datos Beilstein en línea)).

30 Para propósitos ilustrativos, el esquema de reacción ilustrado a continuación proporciona rutas potenciales para sintetizar los compuestos de la presente invención así como también intermediarios claves. Para una descripción más detallada de los pasos de reacción individuales, ver la sección de Ejemplos a continuación. Aquellos con experiencia en el estado de la técnica apreciarán que otras rutas sintéticas pueden utilizarse para sintetizar los compuestos novedosos. Aunque se ilustran materiales de inicio específicos y reactivos en los esquemas y se discuten a continuación, otros materiales y reactivos de inicio pueden fácilmente sustituirse para proporcionar una variedad de derivados y/o condiciones de reacción. Además, muchos de los compuestos preparados mediante los métodos descritos a continuación pueden además modificarse a la luz de esta divulgación usando química convencional bien conocida por aquellos con experiencia en el estado de la técnica.

40 En la preparación de los compuestos de la presente invención, la protección de la funcionalidad remota (ej., grupos hidroxilo) de intermediarios puede ser necesaria. La necesidad para tal protección variará dependiendo de la naturaleza de la funcionalidad remota y las condiciones de los métodos de preparación. Grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen éteres de trialkilsililo donde uno o dos de los grupos alquilo puede ser sustituidos con fenilo. La necesidad de tal protección se determina fácilmente por un experto en la técnica. Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase TW Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

45 Típicamente, los compuestos de la fórmula (I) pueden prepararse de acuerdo con los métodos proporcionados a continuación.

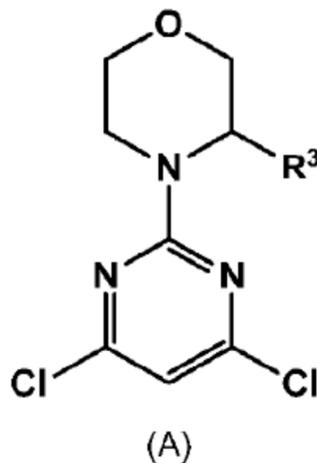
Esquema 1



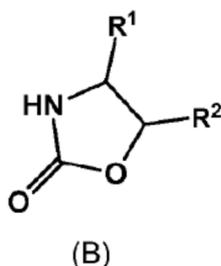
En una realización, la invención se refiere a un proceso para la fabricación de un compuesto de fórmula (I) que comprende los pasos a y b.

5 En una realización, la invención se refiere a un proceso para la fabricación de un compuesto de fórmula (I) (Método A) que comprende los pasos a y b.

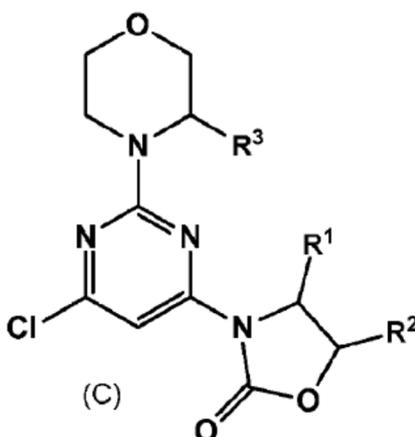
El compuesto de la fórmula (I) se obtiene a través del paso a) de acoplamiento del compuesto de fórmula (A), en la que R³ es como se define para un compuesto de la fórmula (I) anterior



10 con un compuesto de la fórmula (B), en la que R¹ y R² son como se definen para un compuesto de la fórmula (I) anterior,

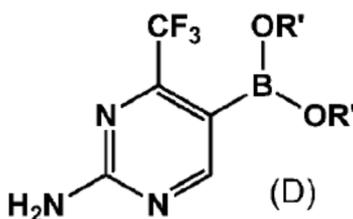


para formar un compuesto de la fórmula (C), en la que R^1 , R^2 y R^3 son como se definen para un compuesto de la fórmula (I) anterior,



5

seguido del paso b) de acoplamiento del compuesto de la fórmula (C) con un compuesto de la fórmula (D), en donde $-B(OR')_2$ representa un ácido borónico cíclico o acíclico o derivado de ácido borónico, tal como pinacolato-boro,



10 En casos en que un grupo protector está presente, se añade un paso de desprotección para convertir el compuesto protegido de la fórmula (I) en el compuesto de la fórmula (I).

15 El paso a) se realiza en presencia de una base tal como NaH. La reacción se lleva a cabo en presencia de un disolvente orgánico tal como DMF a temperaturas de 0 a 80 ° C durante 20 a 30 min. Alternativamente, la reacción puede llevarse a cabo bajo condiciones habituales de Buchwald-Hartwig utilizando un ligando tal como Xantphos, X-Phos o 2-di-*t*-butilfosfino-2'-(*N,N*-dimetilamino) bifenilo con un catalizador de paladio tal como Pd2 (dba)₃ o Pd2 (dba)₃ • CHCl₃ o Pd (OAc)₂, preferentemente Pd2 (dba)₃ con Xantphos, en presencia de una base tal como Cs₂CO₃ o preferiblemente *ter*-BuONa, en un disolvente orgánico tal como un éter, preferiblemente dioxano o THF. La reacción se agita preferiblemente un una temperatura de aproximadamente 80 a 120 ° C. La reacción se lleva a cabo preferiblemente bajo un gas inerte tal como nitrógeno o argón. Las condiciones típicas de reacción conocidas en el campo para las reacciones de Buchwald-Hartwig se pueden aplicar al presente proceso.

20 El paso b) se lleva a cabo en presencia de un catalizador, tal como un catalizador de Pd(0), por ejemplo, PdCl₂ (dppf)-CH₂Cl₂, opcionalmente en la presencia de una o más ayudas de reacción, tales como una base, por ejemplo, una

base acuosa, tal como Na₂CO₃ acuoso, opcionalmente en presencia de uno o más diluyentes, solventes polares, en particular, por ejemplo, DME. La reacción se agita a una temperatura de 80-120 °C aproximadamente. La reacción puede llevarse a cabo bajo un gas inerte tal como nitrógeno o argón. Las condiciones típicas de reacción conocidas en el campo para las reacciones de Suzuki se pueden aplicar al presente proceso.

- 5 Alternativamente, los compuestos de la fórmula (I) también se pueden sintetizar mediante la realización del paso b), seguida del paso a) (Método B).

La invención también incluye cualquier variante de estos procesos, en los cuales un producto intermediario obtenible en cualquier paso de los mismos se utiliza como material de partida y el resto de pasos se llevan a cabo, o en los que los materiales de partida se forman in situ bajo condiciones de reacción, o en los cuales los componentes de reacción se utilizan en la forma de sus sales o material ópticamente puro.

Los compuestos de la invención y los intermediarios también se pueden convertir unos a otros de acuerdo con métodos generalmente conocidos por expertos en el estado de la técnica.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 La composición farmacéutica se puede formular para determinadas rutas de administración tales como administración tópica; administración enteral, tales como por ejemplo oral o rectal, y administración parenteral, tal como por ejemplo intravenosa, intramuscular o subcutánea. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser hechas en una forma sólida (incluyendo sin limitación cápsulas, tabletas, pastillas, gránulos, polvos o supositorios), o en forma líquida (incluyendo, sin limitación, soluciones, suspensiones o emulsiones). Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener diluyentes inertes convencionales, agentes lubricantes, o agentes amortiguadores, así como también adyuvantes, tales como conservadores, estabilizadores, agentes humectantes, emulsificadores y amortiguadores, etc.

25 Composiciones apropiadas para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel y ojos, incluyen soluciones acuosas, suspensiones, ungüentos, cremas, geles, povos, aceites o formulaciones en atomizador, por ejemplo, para liberación mediante aerosol o similares. Tales sistemas de suministro tópico serán en particular apropiados para aplicación dérmica, por ejemplo, para su uso en cremas, lociones, aerosoles y similares. Por lo tanto son particularmente apropiados para utilizar en formulaciones tópicas incluyendo formulaciones cosméticas bien conocidas en el estado de la técnica. Tales pueden contener solubilizantes, estabilizadores, agentes mejoradores de tonicidad, amortiguadores y conservadores.

30 Como se utiliza en la presente una aplicación tópica también se refiere a una inhalación o a una aplicación intranasal por ejemplo al sistema respiratorio. Estas pueden ser convenientemente liberadas en la forma de un polvo seco (bien sea solo, como una mezcla, por ejemplo una mezcla seca con lactosa, o como partículas de componentes mixtos, por ejemplo con fosfolípidos) a partir de un inhalador de polvo seco o una presentación de aerosol a partir de un recipiente presurizado, bomba, atomizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor apropiado.

35 En el contexto de la presente invención, la aplicación se refiere preferiblemente a aplicación tópica tal como la aplicación epicutánea en una composición adecuada que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente y dermatológicamente aceptable. Las composiciones adecuadas para la aplicación epicutánea pueden comprender todas las formas farmacéuticas normalmente utilizadas para esta ruta de administración y son bien conocidas en la técnica, incluyendo soluciones, geles, lociones, suspensiones, cremas, polvos, aceites, ungüentos, espumas, espumas, emulsiones, microemulsiones, leches, sueros, aerosoles, pulverizaciones, dispersiones, microcápsulas, vesículas y micropartículas de los mismos. Estas composiciones son formuladas de acuerdo con técnicas convencionales.

45 Como se usa en este documento, el término "vehículo dermatológicamente aceptable", es un vehículo que es adecuado para aplicación tópica en el tejido queratinoso, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los agentes activos de la presente invención y cualquier otro componente, y no causará ninguna seguridad desfavorable o problemas de toxicidad.

50 El vehículo dermatológicamente aceptable puede estar en una amplia variedad de formas. Por ejemplo, los vehículos de emulsión, incluyendo, pero no limitado a, aceite-en-agua, agua-en-aceite, agua-en-aceite-en-agua, y emulsiones de aceite-en-agua-en-silicio, son útiles en la presente. Como se entenderá por el experto en la materia, un componente dado se distribuirá principalmente en la fase de agua o de aceite/silicona, dependiendo de la solubilidad en agua/dispersabilidad del componente en la composición.

55 La composición adecuada para la aplicación epicutánea, si se desea, puede contener varios aditivos conocidos, tales como excipientes, aglutinantes, lubricantes, y disgregantes. Si se desea, también puede contener materiales oleosos tales como diversas grasas, aceites, ceras, hidrocarburos, ácidos grasos, alcoholes superiores, aceites de ésteres, jabones metálicos, extractos animales o vegetales, agentes gelificantes hidrófilos o lipófilos, agentes activos hidrófilos o lipófilos, otros componentes tales como vitaminas, aminoácidos, agentes tensioactivos, colorantes, tintes, pigmentos,

perfumes, absorbentes de olor, antisépticos, bactericidas, conservantes, humectantes, espesantes, solventes, cargas, antioxidantes, agentes secuestrantes, filtros solares, y similares, y combinaciones de los mismos, como sería conocido por los expertos en la técnica, siempre y cuando sean compatibles con el ingrediente activo.

5 Ejemplos de aceites adecuados incluyen aceites minerales, aceites vegetales tales como aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de soya, aceite de cártamo, aceite de girasol, aceites animales tales como lanolina o perhidroescualeno, aceites sintéticos tales como aceite de Purcellin, aceites de silicona tales como ciclometicona entre otros. Alcoholes grasos, ácidos grasos tales como ácido esteárico y ceras tales como cera de parafina, cera de carnauba o cera de abejas también se pueden usar como grasas.

10 La composición también puede contener agentes emulsionantes, solventes, agentes gelificantes hidrófilos, agentes gelificantes lipófilos, sales metálicas de ácidos grasos, agentes activos hidrófilos o agentes activos lipófilos.

15 Los compuestos de la fórmula (I) en forma libre o en forma de sal, exhiben propiedades farmacológicas valiosas, por ejemplo, propiedades moduladoras de la cinasa PI3 tales como propiedades moduladoras de la cinasa PI3 clase I (PI3K clase I) o propiedades moduladoras de PI3K en combinación con las propiedades moduladoras de mTOR, por ejemplo, como se indica en pruebas in vitro e in vivo como las previstas en la sección experimental, y por lo tanto se indican para la terapia o para su uso como productos químicos de investigación, por ejemplo, como compuestos herramienta.

20 Los compuestos de la fórmula (I) en forma libre o en forma de sal, son útiles en el tratamiento de enfermedades dependientes de la cinasa PI3 clase I, especialmente enfermedades que dependen de las isoformas α y β de la PI3K clase I, así como enfermedades que dependen de las cinasas PI3 clase I, especialmente enfermedades que dependen de las isoformas α y β de la PI3K clase I, en conjunción con la mTOR.

25 Los compuestos que inhiben la actividad de las isoformas α y β de la PI3K clase I, en particular compuestos que son sustancialmente equipotentes de las isoformas α y β PI3K clase I y opcionalmente inhiben también la actividad de mTOR, se considera que son de beneficio debido a que tales compuestos se considera tienen la capacidad de evitar los mecanismos de adaptación debido a recableado de vía a través de las otras isoformas, en comparación con compuestos con especificidad única, por ejemplo, especificidad para un miembro de la familia PI3K clase I. Por "equipotente", se entiende que los compuestos inhiben varias isoformas a un grado comparable, por ejemplo, tal como se mide en un ensayo enzimático o celular descrito en este documento.

30 Adecuadamente, los compuestos de la fórmula (I) muestran fotoestabilidad suficiente con el fin de asegurar y maximizar la actividad de los compuestos de la fórmula (I) cuando se administra de manera epicutánea para reducir al mínimo el potencial de irritación y los efectos secundarios debido a los productos de degradación generados. Los compuestos con fotoestabilidad superior simplificarán el desarrollo técnico y el suministro debido a los riesgos minimizados de fotodegradación. Adecuadamente, los compuestos de fórmula (I) muestran una buena potencia en ensayos celulares utilizando líneas de células humanas derivadas de carcinoma de células escamosas cutáneas. Los compuestos preferidos deben demostrar la capacidad de penetrar en la piel.

35 Los compuestos de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada de, pero no limitado a los cánceres de piel no melanoma, como el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas; sus etapas pre-malignas, tales como la queratosis actínica, queratosis solar y piel crónicamente dañada por el sol, y otros trastornos hiperproliferativos de la piel causadas por la desregulación de los fibroblastos de la piel, tales como fibrosis de la piel, escleroderma, cicatrices hipertróficas o queloides. Los compuestos de la invención pueden ser particularmente útiles en el tratamiento de una indicación seleccionada de, pero no limitada a los cánceres de piel no melanoma.

40 Todos los métodos descritos en la presente pueden realizarse en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o de otra manera sea contradicho claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los Ejemplos, o terminología de ejemplo (*ej.*, "tal como") proporcionada en la presente pretende solamente ilustrar mejor la invención y no implica limitación sobre el alcance de la invención de otra manera reivindicado.

45 En ciertos casos, puede ser ventajoso administrar el compuesto de la presente invención en combinación con al menos un agente farmacéutico adicional (o terapéutico) (por ejemplo, un agente anti-proliferativo o anti-cáncer o terapia adjunta típicamente usado en la quimioterapia). El compuesto de la presente invención se puede administrar ya sea simultáneamente con, o antes o después de, uno o más de otros agentes terapéutico (s). Alternativamente, el compuesto de la presente invención puede administrarse de manera separada, mediante la ruta de administración igual o diferente, o juntas en la misma composición farmacéutica que los otros agentes.

50 En una realización, la invención proporciona un producto que comprende un compuesto de la fórmula (I) y al menos otro agente terapéutico como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en terapia. En una realización, la terapia es el tratamiento de una enfermedad o condición dependiente de cinasas PI3. Los productos proporcionados como una preparación combinada incluyen una composición que comprende el compuesto de la fórmula (I) y los otros agentes terapéuticos en la misma composición farmacéutica, o el compuesto de la fórmula (I) y los otros agentes terapéuticos en forma separada, por ejemplo, en forma de un kit.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula (I) y otros agentes terapéuticos. Opcionalmente, la composición farmacéutica puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describió anteriormente.

5 En una realización, la invención proporciona un kit que comprende dos o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales contiene un compuesto de la fórmula (I). En una realización, el kit comprende medios para retener de manera separada dichas composiciones, tales como un recipiente, botella dividida, o empaque dividido en aluminio. Un ejemplo de tal kit es paquete de burbujas, como el que típicamente se utiliza para empacar tabletas, cápsulas y similares.

10 El kit de la invención puede utilizarse para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral y parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las diferentes composiciones entre sí. Para ayudar en el cumplimiento terapéutico, el kit de la invención típicamente comprende pautas para administración.

15 Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un compuesto de la fórmula (I) para tratar una enfermedad o condición mediada por las cinasas PI3, en donde el medicamento es preparado para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición mediada por las cinasas PI3, en donde el medicamento se administra con un compuesto de la Fórmula (I).

20 La invención también proporciona un compuesto de la fórmula (I) para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR, en donde el compuesto de la fórmula (I) se prepara para administración con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR, en donde el otro agente terapéutico se prepara para administración con un compuesto de la fórmula (I). La invención también proporciona un compuesto de la fórmula (I) para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR, en donde el compuesto de la fórmula (I) se administra con otro agente terapéutico. La invención también proporciona otro agente terapéutico para utilizar en un método de tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR, en donde el otro agente terapéutico se administra con un compuesto de la fórmula (I).

30 La invención también proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula (I) para tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR en donde el paciente se ha tratado previamente (ej., dentro de las 24 horas) con otro agente terapéutico. La invención también proporciona el uso de otro agente terapéutico para tratar una enfermedad o condición mediada por la cinasa PI3 clase I o mediada por la cinasa PI3 clase I y mTOR en donde el paciente se ha tratado previamente (ej., dentro de las 24 horas) con un compuesto de la fórmula (I).

35 En una realización, el otro agente terapéutico se selecciona de agentes terapéuticos adecuados para el tratamiento de cánceres de piel no melanoma, como el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas; sus etapas pre-malignas, tales como la queratosis actínica, queratosis solar y la piel crónicamente dañada por el sol. Adecuadamente, estos otros agentes terapéuticos pueden ser seleccionados a partir de compuestos inmunoestimulantes por ejemplo agonistas de los receptores tipo Toll, tales como imiquimod (Aldara®), o de agentes anti-inflamatorios como el diclofenaco (Solaraze®).

40 La composición farmacéutica o combinación de la presente invención pueden ser típicamente en dosificación unitaria de 1- 1000 mg aproximadamente de ingrediente activo para un sujeto de 50-70 kg aproximadamente, o 1-500 mg aproximadamente o 1-250 mg aproximadamente o 1-150 mg aproximadamente o 0.5-100 mg aproximadamente, o 1-50 mg aproximadamente de ingredientes activos. La dosificación unitaria también puede ser de aproximadamente 50 a aproximadamente 1000 mg de ingrediente activo para un sujeto de 50 a 70 kg aproximadamente, o de 50 a 500 mg aproximadamente o de 50 a 250 mg aproximadamente o de 50 a 150 mg aproximadamente o de 50 a 100 mg aproximadamente de ingredientes activos. La dosificación puede depender de la forma de dosificación particular utilizada para suministrar el ingrediente activo. En general, la dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto, la composición farmacéutica, o las combinaciones de los mismos, es dependiente de la especie del sujeto, el peso corporal, la edad y condición individual, el trastorno o la enfermedad o la gravedad de la misma que se está tratando. La dosificación también puede depender de la biodisponibilidad del ingrediente activo en la especie siendo tratada. Un médico, farmaceuta, médico clínico o veterinario de experiencia común puede determinar fácilmente la cantidad efectiva de cada uno de los ingredientes activos necesarios para prevenir, tratar o inhibir el progreso del trastorno o enfermedad.

55 Las propiedades de dosificación antes citadas son demostrables en pruebas *in vitro* y *in vivo* utilizando de manera ventajosa mamíferos, por ejemplo, ratones, ratas, perros, monos u órganos aislados, tejidos y preparaciones de los mismos. Los compuestos de la presente invención se pueden aplicar *in vitro* en la forma de soluciones, por ejemplo soluciones acuosas preparadas a partir de, por ejemplo, solución concentrada de DMSO 10 mM, e *in vivo* ya sea por vía enteral, parenteral, ventajosamente por vía intravenosa o por vía tópica, por ejemplo, como una suspensión, en solución acuosa o en otras soluciones, tales como por ejemplo, en solución a base de glicol propileno. La dosificación

in vitro puede estar en el rango entre concentraciones 10^{-3} molar y 10^{-9} molar aproximadamente. Una cantidad terapéuticamente efectiva *in vivo* puede estar en el rango dependiendo de la ruta de administración, entre 0.1 y 500 mg/kg aproximadamente, o entre 1 y 100 mg/kg aproximadamente.

Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos tienen el propósito de ilustrar la invención y no deben interpretarse como limitaciones de la misma. Las temperaturas son dadas en grados centígrados. Si no se menciona lo contrario, todas las evaporaciones son realizadas bajo presión reducida, preferiblemente entre 15 mm Hg y 100 mm Hg aproximadamente (=20-133 mbar). La estructura de los productos finales, intermediarios y materiales de inicio es confirmada por métodos analíticos estándar, por ejemplo, microanálisis y características espectroscópicas, por ejemplo, MS, IR, RMN. Las abreviaturas utilizadas son las convencionales en la técnica.

10 Todos los materiales de inicio, componentes fundamentales (materia prima), reactivos, ácidos, bases, agentes deshidratantes, solventes y catalizadores utilizados para sintetizar los compuestos de la presente invención están comercialmente disponibles o pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por alguien con habilidad común en el estado de la técnica (Houben-Weyl 4th Ed. 1952, Methods of Organic Synthesis, Thieme, Volume 21). Además, los compuestos de la presente invención pueden producirse mediante métodos de síntesis orgánica conocidos por un experto en el estado de la técnica como se muestra en los siguientes ejemplos.

15 A menos que se especifique lo contrario, los materiales de inicio generalmente están disponibles de fuentes comerciales tales como Aldrich Chemicals Co. (Milwaukee, Wis.), Lancaster Synthesis, Inc. (Windham, N.H.), Acros Organics (Fairlawn, N.J.), Maybridge Chemical Company, Ltd. (Cornwall, England), Tyger Scientific (Princeton, N.J.), y AstraZeneca Pharmaceuticals (London, England).

Abreviaturas

Las abreviaturas utilizadas en los siguientes Ejemplos tienen los correspondientes significados listados a continuación.

| | | |
|----|---------------------------------|--|
| | AcOH | ácido acético |
| | Aq | acuoso |
| 25 | Ax | axial |
| | Boc | <i>ter</i> -butoxicarbonilo |
| | Salmuera | Solución de cloruro de sodio saturado (a temperatura ambiente) |
| | Br s | singulete amplio |
| | CDCl ₃ | cloroformo deuterado |
| 30 | CHCl ₃ - <i>d</i> | cloroformo deuterado |
| | CH ₂ Cl ₂ | diclorometano |
| | CH ₃ CN | acetonitrilo |
| | conc. | concentrado |
| | CsF | fluoruro de cesio |
| 35 | CuSO ₄ | Sulfato de cobre |
| | d | doblete |
| | DIPEA | di-isopropiletil- amina |
| | DME | dimetoxietano |
| | DMF | <i>N,N</i> -dimetilformamida |
| 40 | DMSO | dimetilsulfóxido |
| | DMSO- <i>d</i> ₆ | dimetilsulfóxido deuterado |
| | dppf | 1,1'-bis (difenilfosfino) ferroceno |
| | eq | ecuatorial |

| | | |
|----|--|---|
| | ESI-MS | Espectrometría de masas por electroatomización |
| | Et ₂ O | éter dietílico |
| | EtOH | etanol |
| | EtOAc | acetato de etilo |
| 5 | h | horas |
| | Hyflo | Hyflo Super Cel® |
| | ¹ H RMN | resonancia magnética nuclear protónica |
| | KO | Acetato de potasio |
| | KHSO ₄ | sulfato ácido de potasio |
| 10 | K ₂ CO ₃ | carbonato de potasio |
| | LC-MS | cromatografía de líquidos- espectrometría de masas |
| | LDA | diisopropilamina de litio |
| | MeOH | metanol |
| | MgSO ₄ | sulfato de magnesio |
| 15 | M | molar |
| | m | múltiplo |
| | MS | espectrometría de masas |
| | min | minutos |
| | mL | mililitros |
| 20 | m.p. | punto de fusión |
| | MgSO ₄ | sulfato de magnesio |
| | MHz | megahertz |
| | N | normal |
| | NaHMDS | Hexametildisilazano de sodio |
| 25 | NMR | resonancia magnética nuclear |
| | NEt ₃ | trietilamina |
| | Na ₂ S ₂ O ₃ | tiosulfato de sodio |
| | Na ₂ SO ₄ | sulfato sódico |
| | Pd ₂ (dba) ₃ | tris(dibencilidenoacetona)dipaladio (0) |
| 30 | PdCl ₂ (dppf) | dicloruro de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno paladio (II) |
| | PdCl ₂ (dppf).CH ₂ Cl ₂ | Complejo de dicloruro 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno-paladio(II) - diclorometano |
| | PPh ₃ | trifenilfosfina |
| | Pd(PPh ₃) ₄ | tetrakis(trifenilfosfina)paladio |
| | Pd | paladio |
| 35 | qt | quinteto |
| | Raney-Ni | níquel de Raney |
| | RT | temperatura ambiente |

| | | |
|----|------------------|--|
| | R _f | Factor de retención (TLC) |
| | R _t | tiempo de retención |
| | S | singulete |
| | SiO ₂ | gel de sílice |
| 5 | t | triplete |
| | TBAF | fluoruro de tetrabutilamonio |
| | TBDPSCI | Cloruro de ter-butildifenilsililo |
| | TBME | ter-butilmetiléter |
| | TFA | ácido trifluoroacético |
| 10 | THF | tetrahidrofurano |
| | TLC | cromatografía de capa delgada |
| | t _R | tiempo de retención |
| | UV | ultravioleta |
| | UPLC: | Cromatografía de líquidos de ultra desempeño |

15 Métodos generales

Las mediciones ¹H-RMN se realizaron en un espectrómetro *Bruker Ultrashield™* 400 (400 MHz), *Bruker Ultrashield™* 600 (600 MHz) o *Bruker DRX 500 MHz CryoProbe* (500 MHz) con o sin tetrametilsilano como patrón interno. Los desplazamientos químicos (valores δ) se presentan en ppm campo abajo de tetrametilsilano, constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz, los patrones de partición espectros se designan como singulete (s), doblete (d), doblete de doblete (dd), triplete (t), cuadruplete (q), multiplete o más señales solapadas (m) y señal amplia (br). Los solventes se dan en parentesis.

TLC se realizó con placas de vidrio previamente recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemania) utilizando los respectivos sistemas solventes nombrados. La visualización generalmente se hizo por luz UV (254 nm).

LC- MS

25 LC- MS- Método 1:

Columna: Acquity HSS T3, 1.8 μm, 2.1 x 50 mm;

Eluyente: Agua (+ ácido fórmico al 0.05% + acetato de amonio 3.75 mM): acetonitrilo (ácido fórmico + 0.04%), de 95:5 a 2:98 en 1.4 min, se mantuvo 98% durante 0.75 min;

Tasa de flujo/temperatura: 1.0 mL/min a 60°C

30 LC- MS- Método 2:

Columna: Acquity HSS T3, 1.8 μm, 2.1 x 50 mm;

Eluyente: Agua (+ ácido fórmico al 0.05% + acetato de amonio 3.75 mM) : acetonitrilo (ácido fórmico + 0.04%), de 98:2 a 2:98 en 1.4 min, se mantuvo 98% durante 0.75 min;

Tasa de flujo/temperatura: 1.2 mL/min a 50°C

35 UPLC 1

Columna: Acquity UPLC HSS T3 C18, 1.7 μm 2.1 x 50 mm, Flujo: 1.0 mL/min. Gradiente: 5% a 100% B en 1.5 min, 100% B durante 1 min, A = agua + TFA al 0.1%, B = acetonitrilo + TFA al 0.1%

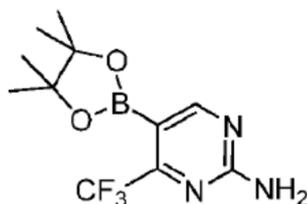
Detección: 218 nm o 254 nm

Síntesis de intermediarios de éster bórico

40 Los intermediarios de éster bórico utilizados en la preparación de los compuestos de la presente invención están comercialmente disponibles o pueden prepararse como se describe en la literatura, o de una manera análoga, o

pueden prepararse como se describe a continuación, o de una manera análoga.

Intermediario 1: 5 - (4,4,5,5- tetrametil- 1, 3,2- dioxaborolan- 2- il)- 4- trifluorometil) pirimidin- 2- amina



a) 5- Bromo- 4- trifluorometil- pirimidin- 2- ilamina

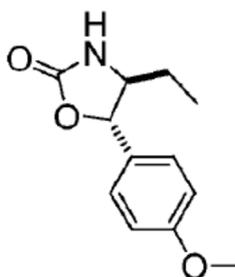
5 A una solución de 2- amino- 4- trifluorometilpirimidina (25 g, 0.15 moles) en CH₃CN (600 ml) se añadió una solución en la oscuridad de N- bromosuccinimida (34.8 g, 195 milimoles) en acetonitrilo (200 ml) durante un período de 2.5 h. La mezcla de reacción se agitó durante 4.5 h a temperatura ambiente y luego se concentró. El residuo se disolvió en EtOAc y H₂O, los solventes orgánicos se separaron, se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando EtOAc en hexano del 10% a 40% para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color beige (31.2 g, 85%). LC- MS: Rt 0.82 min; (LCMS Método 2).

b) 5 - (4,4,5,5- tetrametil- 1, 3,2- dioxaborolan- 2- il) - 4 - (trifluorometil) pirimidin- 2- amina

15 A una suspensión de 5- bromo- 4- trifluorometil- pirimidin- 2- ilamina (16.2 g, 66.3 milimoles), bis- pinacolatodiboron (18.5 g, 72.9 milimoles) y KOAc (19.5 g, 199 milimoles) en dioxano (300 ml) en atmósfera de argón se añadió aducto PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (2.44 g, 2.98 milimoles) y la mezcla se agitó durante 4 horas a 115 °C. La mezcla de reacción se enfrió a 50 °C y se trató con EtOAc. La suspensión resultante se filtró a través de Hyflo y se lavó con EtOAc. El filtrado combinado se concentró. El residuo se suspendió en NaOH 2 M, se agitó a temperatura ambiente durante 5 min y después se añadió Et₂O y H₂O. La mezcla binaria se filtró de nuevo a través de Hyflo y se separaron las fases. El pH de la capa acuosa resultante se ajustó a 5- 6 con HCl 4 M acuosa, y el producto se extrajo con EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se trituró en Et₂O/hexano, se filtró y se secó para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo claro (8.33 g, 42%). LC- MS: [M+H] 290.2; Rt 1.00 min; (LCMS Método 2).

Síntesis de los intermediarios de oxazolidinona

Intermediario 2: (4S *, 5S *)- 4- etil- 5- (4- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona



a) (1S *, 2S *) - 1 - (4- metoxifenil)- 2- nitrobutan- 1- ol

25 30 A una solución de LiAlH₄ (2 M en THF) (1.84 ml, 3.67 milimoles) en THF seco (100 ml), que se había agitado durante 30 min a 0 °C, se añadió 1- nitropropano (16.3 ml, 184 milimoles) en atmósfera de argón. Después de 30 min, se añadió el 4- metoxi- benzaldehído (4.45 ml, 36.7 milimoles) en una porción. La mezcla se agitó durante 6 horas a 0 °C y 18 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se apagó con HCl (1 M en H₂O) y se extrajo con CH₂Cl₂. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando CH₂Cl₂ en hexano de 0% a 100% para proporcionar el compuesto del título (1.4 g, 34%). ¹H RMN (600 MHz, DMSO- d₆): 7.35 (d, 2H), 6.94 (d, 2H), 5.94 (d, 1 H), 4.80 (dd, 1H), 4.68- 4.52 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 1.75- 1.69 (m, 1H), 1.25- 1.20 (m, 1H), 0.74 (t, 3H).

b) (1S *, 2S *)- 2- amino- 1- (4- metoxifenil) butan- 1- ol

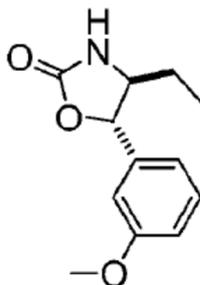
Una solución de (1S *, 2S *) - 1 - (4- metoxifenil)- 2- nitrobutan- 1- ol (1.0 g, 4.44 milimoles) en etanol (20 ml) se purgó

con argón, y se añadió Pd/C (100 mg, 0.094 milimoles) a temperatura ambiente. El recipiente sellado se purgó y se volvió a llenar con H₂ y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. La mezcla de reacción se filtró sobre celite, se lavó con etanol y se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando CH₂Cl₂/MeOH/(NH₄OH en H₂O) de 100:0:0 a 80:20:1 para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (450 mg, 51.4%). LC- MS: [M+H] 196.1; Rt 0.44 min; (LCMS Método 2).

c) (4S *, 5S *)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona

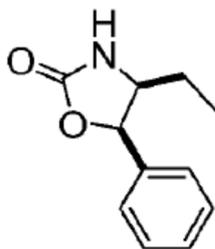
A una solución de (1S *, 2S *)- 2- amino- 1- (4- metoxifenil) butan- 1- ol (440 mg, 2.25 milimoles) en CH₂Cl₂ (15 ml) se añadió en atmósfera de argón NEt₃ (0.78 ml, 5.63 milimoles) a 0 °C. Luego se añadió difosgeno durante un período de 5 minutos y la temperatura se mantuvo a 0 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se apagó con agua helada y una solución acuosa 2 M de Na₂CO₃, se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se trituró con TBME, se filtró y se secó para proporcionar el intermediario 2 [(4S *, 5S *)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona] como un polvo blanco (220 mg, 44%). LC- MS: [M+H] 222.2; Rt 0.77 min; (LCMS Método 2). ¹H RMN (600 MHz, DMSO- d₆): 7.94 (br s, 1H), 7.32 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 5.06 (d, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.51 (q, 1H), 1.53 (qt, 2H), 0.85 (t, 3H).

Intermediario 3: (4S *, 5S *)- 4- etil- 5- (3- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona



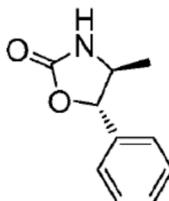
El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el intermediario 2 [(4R *, 5R *)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona] para proporcionar el intermediario 3 como un aceite incoloro. LC- MS: [M+H] 222.1; Rt 0.79 min; (LCMS Método 2). ¹H RMN (600 MHz, DMSO- d₆): 7.98 (br s, 1H), 7.35- 7.29 (m, 1H), 6.83- 6.96 (m, 3H), 5.10 (d, 1H), 3.72- 3.78 (m, 3H), 3.36- 3.29 (m, 1H), 1.49- 1.63 (m, 2H), 0.88 (t, 3H).

Intermediario 4: (4S *, 5R *)- 4- etil- 5- feniloxazolidin- 2- ona



El compuesto del título se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito para el intermediario 2 [(4R *, 5R *)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona] para proporcionar el intermediario 4 como un sólido blanco. LC- MS: [M+H] 192.1; Rt 0.77 min; (LCMS Método 2)

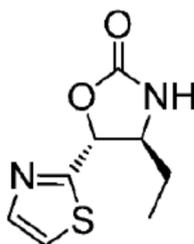
Intermediario 5: (4S, 5S)- 4- metil- 5- feniloxazolidin- 2- ona



A una solución de (1S, 2S) - (+)- Noreudoefedrina (2.00 g, 13.2 milimoles) en CH₂Cl₂ (60 ml) se añadió en atmósfera de argón Et₃N (4.61 ml, 33.1 milimoles) a 0 °C. Luego se añadió lentamente trifosgeno (1.57 g, 5.29 milimoles) disuelto

en 20 ml de CH₂Cl₂, y la temperatura se dejó calentar desde 0 °C a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción se apagó mediante la adición de NH₄Cl acuoso. Las capas orgánicas se separaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 0% a 100% con el fin de proporcionar el producto deseado (2.10 g, 89%). LC- MS: [M+H] 178.1; Rt 0.67 min; (LCMS Método 2). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) 7.88 (br s, 1H), 7.50- 7.32 (m, 5H), 5.09 (d, 1H), 3.78- 3.62 (m, 1H), 1.26 (d, 3H).

Intermediario 6: (4S, 5R)- 4- etil- 5- (tiazol- 2- il) oxazolidin- 2- ona



a) ácido (S)- 2- (((benciloxi) carbonil) - 2) amino) butanoico

10 A una solución de (S)- 2- aminobutanoico (11.2 g, 109 milimoles) en THF (200 ml) y una solución de carbonato de sodio 2 M acuoso (65.2 ml, 130 milimoles) se añadió por goteo a 0 °C clorocarbonato de bencilo (17.06 ml, 119 milimoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 16 horas, la mezcla de reacción se extrajo con H₂O/TBME, la capa acuosa se acidificó con HCl (2 M en H₂O) hasta pH = 2 y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y el filtrado se concentró para proporcionar el compuesto del título (22.8 g, 77%) como un aceite incoloro. El producto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LC- MS: [M- H] 236.2; Rt 0.76 min; (LCMS Método 1).

b) 2 - (((benciloxi) carbonil) amino) butanoato de (S)- metilo

20 A una solución de ácido (S) - 2 - (((benciloxi) carbonil) amino)butanoico (10.0 g, 42.1 milimoles) en metanol (100 ml) y tolueno (300 ml) se añadió por goteo a temperatura ambiente en atmósfera de argón trimetilsilildiazometano (23.2 ml, 46.4 milimoles). Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla de reacción se concentró y el residuo se extrajo con una solución de EtOAc y salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró. El residuo se purificó por cromatografía en columna (120 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 30% con el fin de proporcionar el compuesto del título (5.2 g, 48%) como un aceite incoloro. LC- MS: [M+H] 252.1; Rt 0.93 min; (LCMS Método 1).

25 c) (S)-(1- oxobutan- 2- il) carbamato de bencilo

30 A una solución de 2 - (((benciloxi) carbonil) amino) butanoato de (S)- metilo (2.0 g, 7.96 milimoles) en tolueno (50 ml) se añadió por goteo a - 78 °C en atmósfera de argón DIBAL- H (1 M en tolueno) (15.9 ml, 15.9 milimoles) durante un período de 20 minutos y la mezcla de reacción se agitó a - 78 °C durante 1 hora. La mezcla de reacción se apagó a - 78 °C con una solución acuosa 1.5 M de tartrato de sodio y potasio (20 ml), y se dejó calentar a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrajo con una solución de EtOAc y salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (24 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 30% con el fin de proporcionar el compuesto del título (1.18 g, 64%) como un aceite incoloro. LC- MS: [M+H] 222.2; Rt 1.01 min; (LCMS Método 1). ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 9.61 (s, 1H), 7.27- 7.43 (m, 5H), 5.39 (br s, 1H), 5.15 (m, 2H), 4.15 (q, 1H), 1.96 - 2.11 (m, 1H), 1.64- 1.82 (m, 1H), 1.01- 0.79 (m, 3H).

35 d) ((1R, 2S)- 1- hidroxil- 1- (tiazol- 2- il) butan- 2- il) carbamato de bencilo

40 A una solución de (1- oxobutan- 2- il)carbamato de (S)- bencilo (1.1 g, 4.97 milimoles) en diclorometano (30 ml) se añadió por goteo a - 30 °C en atmósfera de argón 2 - (trimetilsilil) tiazol (939 µl, 5.97 milimoles) durante un período de 10 min. Luego, la mezcla de reacción se agitó a - 30 °C durante 20 minutos, se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró a 30 °C y se disolvió en THF (30 ml). Se añadió TBAF (1M en THF) (5.97 ml, 5.97 milimoles) a 0 °C en atmósfera de argón y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se extrajo con EtOAc. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con carbonato sódico acuoso, agua y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (24 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 30% con el fin de proporcionar el compuesto del título (1.18 g, 64%) como un aceite incoloro. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (24 g de SiO₂) usando MeOH en CH₂Cl₂ hexano de 0% a 4% para proporcionar el compuesto del título (340 mg, 43%) como un aceite incoloro. LC- MS: [M+H] 307.5; Rt 0.86 min; (LCMS Método 1).

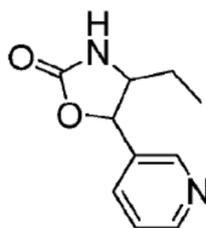
e) (1R, 2S)- 2- amino- 1- (tiazol- 2- il) butan- 1- ol

A una solución de ((1R, 2S)- 1- hidroxil- 1- (tiazol- 2- il) butan- 2- il) carbamato de bencilo (330 mg, 1.077 milimoles) en acetonitrilo (25 ml) a 0 °C bajo argón, se añadió piperidina (0.213 ml, 2.154 milimoles) y por goteo yodotrimetilsilano (293 µl, 2.15 milimoles) durante un período de 5 minutos. Luego, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A la mezcla de reacción se añadió a 0 °C a tiosulfato de sodio (500 mg), seguido de agua (0.5 ml), y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a 0 °C durante 15 minutos. Se añadió más 500 mg de tiosulfato de sodio, y la mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró. El residuo se trituró con EtOAc, se filtró, y el filtrado se concentró para proporcionar el compuesto del título (250 mg, 67%) como un aceite de color amarillo.

f) (4S, 5R)- 4- etil- 5- (tiazol- 2- il) oxazolidin- 2- ona

- 10 El compuesto del título se preparó a partir de (1R, 2S)- 2- amino- 1- (tiazol- 2- il) butan- 1- ol de acuerdo con el procedimiento descrito para intermediario 2 para proporcionar el intermediario 6 (410 mg, 95%) como un aceite de color marrón. Este producto se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Intermediario 7: 4- etil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona



- 15 a) 2- Nitro- 1- piridin-3-il- butan-1-ol

A una solución de LiAlH₄ (2M en THF) (0.93 ml, 1.87 milimoles) en THF seco (80 ml) a 0 °C, se añadió lentamente 1-nitropropano (8.30 ml, 93 milimoles) en atmósfera de argón. Después de 60 min, se añadió en una porción nicotinaldehído (2.00 g, 18.7 milimoles). La mezcla se agitó durante 16 horas, al tiempo que permitió que la temperatura suba de 0 °C a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se apagó mediante la adición de 1 ml de HCl acuoso 2 M, seguido de la adición de 4 gramos de Na₂SO₄. La suspensión resultante se agitó durante 15 minutos y después se filtró. El filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (40 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (2.6 g, 71%) como una mezcla de diastereoisómeros A y B. La CL - MS: [M+H]⁺ 197.1; Rt 0.52 min; (LCMS método 1). A) ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 8.70- 8.60 (m, 2H), 7.80- 7.74 (m, 1H), 7.42- 7.32 (m, 1H), 5.28 (dd, 1H), 4.70- 4.58 (m, 1H), 2.97 (d, 1H), 2.29- 2.12 (m, 1H), 1.65- 1.42 (m, 1H), 0.99 (t, 3H). B) ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 8.70- 8.60 (m, 2H), 7.80- 7.74 (m, 1H), 7.42- 7.32 (m, 1H), 5.15 (dd, 1H), 4.70- 4.58 (m, 1H), 2.81 (d, 1H), 1.99- 1.85 (m, 1H), 1.65- 1.42 (m, 1H), 0.94 (t, 3H).

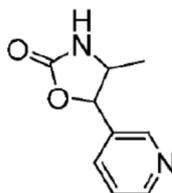
b) 2- amino- 1- piridin- 3- il- butan- 1- ol

Una solución de 2- nitro- 1- piridin- 3- butan- 1- il- ol (1.0 g, 4.44 milimoles) en etanol (20 ml) se purgó con argón, y se añadió 100 mg de níquel Raney a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evacuó tres veces y volvió a llenar de nuevo con hidrógeno. La reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Luego níquel Raney se filtró a través de Hyflo, y el Hyflo se lavó con EtOH. Luego el filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (40 g de SiO₂) usando MeOH en CH₂Cl₂ del 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un aceite de color amarillo (180 mg, 21%). LC- MS: [M+H]⁺ 167.1; Rt 0.21 min; (LCMS Método 1).

c) 4- etil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona

A una solución de 2- amino- 1- piridin- 3- butan- 1- il- ol (150 mg, 0.90 milimoles) en CH₂Cl₂ (5 ml) se añadió en atmósfera de argón NEt₃ (314 µl, 5.63 milimoles) a 0 °C. Luego, se añadió difosgeno durante un período de 5 minutos y la temperatura se dejó calentar desde 0 °C a temperatura ambiente en 2 horas. La mezcla de reacción se apagó con agua helada y una solución 2 M de Na₂CO₃, se extrajo con CH₂Cl₂, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título (100 mg, 58%) como una mezcla de diastereoisómeros A y B. La LC- MS: [M+H]⁺ 193.1; Rt 0.43 min; (LCMS método 1). A) ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 8.70- 8.62 (m, 1H), 8.60- 8.56 (m, 1H), 7.76- 7.71 (m, 1H), 7.42- 7.35 (m, 1H), 5.78 (d, 1H), 4.08- 3.98 (m, 1H), 1.21 a 1.5 (m, 2H), 0.84 (t, 3H). B) ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 8.70- 8.62 (m, 2H), 7.80- 7.76 (m, 1H), 7.42- 7.35 (m, 1H), 5.21 (d, 1H), 3.75- 3.68 (m, 1H), 1.89- 1.69 (m, 2H), 1.05 (t, 3H).

Intermediario 8: 4- metil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona



a) 2- Nitro- 1- piridin- 3-il- propan- 1- ol

5 A una solución de LiAlH_4 (2M en THF) (1.4 ml, 2.8 milimoles) en THF seco (110 ml) a 0 °C, se añadió lentamente 1-nitroetano (2.00 ml, 28 milimoles) en atmósfera de argón. Después de 20 min a 0 °C, se añadió nicotinaldehído (2.64 ml, 28 milimoles) en una porción. La mezcla se agitó durante 16 horas, al tiempo que permite que la temperatura suba de 0 °C a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se apagó mediante la adición de 5 ml de HCl 1 M, seguido de la adición de CH_2Cl_2 y Na_2SO_4 . La suspensión resultante se agitó durante 15 minutos y después se filtró. El filtrado se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (40 g de SiO_2) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el producto como un aceite (3.2 g, 63%) como una mezcla de diastereoisómeros.

10 LC- MS: [M+H] 183.4; Rt 0.41 min; (LCMS Método 1). A) ^1H RMN (400 MHz, CHCl_3 - d): 8.58- 8.48 (m, 2H), 7.68 (d, 1H), 7.33- 7.23 (m, 1H), 5.42- 5.38 (m, 1H), 4.70- 4.60 (m, 1H), 3.30- 2.90 (br s, 1H), 1.46 (d, 3H). B) ^1H RMN (400 MHz, CHCl_3 - d): 8.58- 8.48 (m, 2H), 7.68 (d, 1H), 7.33- 7.23 (m, 1H), 5.04 (d, 1H), 4.76- 4.69 (m, 1H), 3.30- 2.90 (br s, 1H), 1.31 (d, 3H).

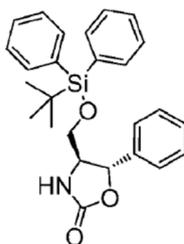
b) 4- metil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona

15 Una solución de 2- nitro- 1- piridin- 3- butan- 1- il- ol (3.20 g, 17.6 milimoles) en etanol (90 ml) se purgó con argón, y se añadió 200 mg de níquel Raney a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evacua tres veces y se llenó nuevamente con hidrógeno. La reacción se agitó durante 16 horas en atmósfera de H_2 a temperatura ambiente. Luego, níquel Raney se filtró a través de Hyflo, y el Hyflo se lavó con EtOH. Luego el filtrado se concentró con el fin de proporcionar 2- amino- 1- piridin- 3-il- propan- 1- ol como un producto (2.35 g, 88%), que se utilizó en la siguiente etapa de reacción sin purificación. A una solución de 2- amino- 1- piridin- 3-il- propan- 1- ol (700 mg, 4.60 milimoles) en CH_2Cl_2 (20 ml) se añadió en atmósfera de argón Et_3N (1.60 ml, 11.5 milimoles) a 0 °C, seguido de trifosgeno (819 mg, 2.76 milimoles, disuelto en 5 ml de CH_2Cl_2). La temperatura de reacción se dejó calentar desde 0 °C a temperatura ambiente en una hora. La mezcla de reacción se apagó con agua helada y una solución 2 M de Na_2CO_3 , se extrajo con CH_2Cl_2 , se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el producto (160 mg, 20%). LC- MS: [M+H] 179.1; Rt 0.31 min; (LCMS Método 1).

20

25

Intermediario 9: (4S, 5S) - 4 - ((ter- butildifenilsililoxi) metil)- 5- feniloxazolidin- 2- ona



a) (4S, 5S)- 4- hidroximetil- 5- fenil- oxazolidin- 2- ona

30 (1S, 2S)- 2- amino- 1- fenil- propano- 1,3- diol (20.0 g, 120 milimoles), carbonato de dietilo (29.7 ml, 245 milimoles), y K_2CO_3 (1.65 g, 12.0 milimoles) se cargaron en un matraz con agitador mecánico y una columna de Vigreux. Esta suspensión se calentó en un baño de aceite a 135 °C, para proporcionar una solución de color amarillo. El EtOH acumulado se separó por destilación sobre una columna de Vigreux. La reacción se agitó durante un período de 3 h, hasta que no se pudo destilar más EtOH. La mezcla de reacción se enfrió a 50 °C, se diluyó con EtOAc y NaHCO_3 acuoso. Las capas orgánicas se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (550 g de SiO_2) usando EtOAc en heptano del 33% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un aceite de color beige (7.50 g, 33%). ^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 7.87 (br s, 1H), 7.50- 7.30 (m, 5H), 5.37 (d, 1H), 5.23- 5.17 (m, 1H), 3.70- 3.60 (m, 1H), 3.60- 3.50 (m, 2H).

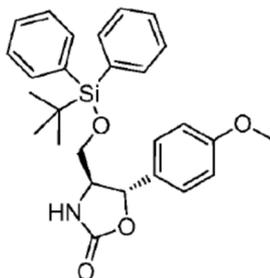
35

b) (4S, 5S) - 4 - ((ter- butildifenilsililoxi) metil)- 5- feniloxazolidin- 2- ona

A una solución de (4S, 5S)- 4- hidroximetil- 5- fenil- oxazolidin- 2- ona (3.50 g, 17.2 milimoles), NEt_3 (4.80 ml, 34.4 milimoles), y DMAP (105 mg, 861 milimoles) en DMF (20 ml) se añadió por goteo TBDPSCI (4.86 ml, 18.9 milimoles)

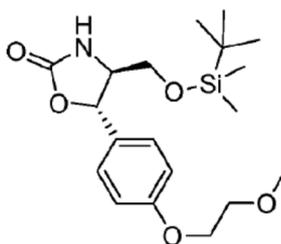
a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, la mezcla de reacción se concentró y se diluyó con TBME, las capas orgánicas se separaron, se lavaron con NaHCO₃ acuoso y salmuera, se secaron sobre MgSO₄, y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (120 g de SiO₂) usando EtOAc en heptano del 0% a 60% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (4.28 g, 57%). LC- MS: [M+H] 432.2; Rt 1.36 min; (LCMS Método 2).

Intermediario 10: (4S, 5S) - 4 - (((ter- butildifenilsilil) oxi) metil) - 5 - (4- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona



A una solución de (4S, 5S) - 4 - (hidroximetil) - 5 - (4- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona [545435- 91- 4] (0.68 g, 3.05 milimoles) e imidazol (0.249 g, 3.66 milimoles) en DMF (10 ml) se añadió por goteo TBDPSCI (0.97 ml, 3.66 milimoles) a 0- 5 °C. La mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró y el aceite residual se disolvió en TBME y se lavó con una solución acuosa de KHSO₄, H₂O, solución al 10% saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 5% al 50% para proporcionar el compuesto del título como una espuma blanca (1.62 g, 55%). TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.44; LC- MS: [M+H] 462; Rt 1.36 min; (LCMS método 2) ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.65 (d, 4H), 7.35- 7.60 (m, 6H), 7.24 (d, 2H), 6.92 (d, 2H), 5.24 (d, 1H), 5.20 (br s, 1H), 3.84 (m, 4H), 3.77 (m, 2H), 1.09 (s, 9H).

Intermediario 11: (4S, 5S) - 4 - (((ter- butildimetilsilil) oxi) metil) - 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil) oxazolidin- 2- ona



a) (R)-2 - ((ter- butoxicarbonil) amino) - 3 - (4 - (2- etoxietoxi) fenil)propanoato de metilo

A una suspensión de (R)-2 - ((ter- butoxicarbonil) amino) - 3 - (4- hidroxifenil) propanoato de metilo (4.43 g, 15.00 milimoles), K₂CO₃ (4.15 g, 30.0 milimoles) y yoduro de sodio (112 mg, 750 milimoles) en acetonitrilo (100 ml) se añadió 1- bromo- 2- metoxietano (5.64 ml, 60.0 milimoles) y la mezcla resultante se agitó a reflujo durante 2 días. La mezcla de reacción se diluyó con TBME y se lavó con H₂O y salmuera. Los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillo (5.3 g, 95%). TLC (tolueno/TBME 2:1) R_f = 0.44; t_R = 1.084 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 354; Rt 1.02 min; (LCMS Método 2); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.05 (d, 2H), 6.88 (d, 2H), 4.96 (br d, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.12 (dd, 2H), 3.76 (dd, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.05 (m, 2H), 1.44 (s, 9H).

b) (4R, 5S)- 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil)- 2- oxooxazolidin- 4- carboxilato de metilo

A una solución de (R)- 2 - ((ter- butoxicarbonil) amino) - 3 - (4- hidroxifenil)propanoato de metilo (5.34 g, 14.35 milimoles) en acetonitrilo (260 ml) se añadió en atmósfera de argón una solución de persulfato de potasio (7.76 g, 28.7 milimoles) en H₂O (190 ml) y una solución de CuSO₄ (0.458 g, 2.87 milimoles) disuelto en H₂O (70 ml). La mezcla resultante se agitó durante 3 horas a 70 °C. La mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 20% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un aceite de color amarillo (2.33 g, 52%). TLC (heptano/EtOAc 1:2) R_f = 0.19; t_R = 0.680 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 296; Rt 0.68 min; (LCMS Método 2); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.36 (d, 2H), 6.99 (d, 2H), 5.86 (br d, 1H), 5.62 (d, 1H), 4.30 (d, 1H), 4.16 (dd, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.79 (dd, 2H), 3.48 (s, 3H).

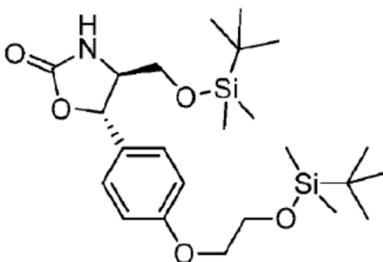
c) (4S, 5S) - 4 - (hidroximetil) - 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil) oxazolidin- 2- ona

A una suspensión de (4R, 5S)- 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil)- 2- oxooxazolidin- 4- carboxilato de metilo (2.30 g, 7.79 milimoles) en EtOH (45 ml) se añadió en porciones a 0 - 5 °C borohidruro de sodio (648 mg, 17.1 milimoles). La mezcla de reacción se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente y después se acidificó con HCl acuoso 4 M (10 ml) a 0- 5 °C. La mezcla de reacción se concentró y el producto se extrajo con EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título como una espuma beige (1.80 g, 81%) t_R = 0.498 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 268; R_t 0.55 min; (LCMS Método 2); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.31 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 6.45 (br s, 1H), 5.33 (d, 1H), 5.30 (br s, 1H), 3.75- 4.30 (m, 7H), 3.47 (s, 3H).

10 d) (4S, 5S) - 4 - (((ter- butildimetilsilil) oxi) metil) - 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil) oxazolidin- 2- ona

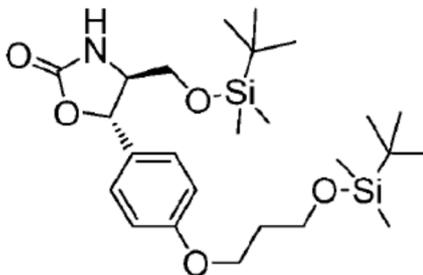
El compuesto del título se preparó de forma análoga al procedimiento descrito para el compuesto intermediario 10 [(4S, 5S) - 4 - (((ter- butildifenilsililo) oxi) metil) - 5 - (4- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona] a partir de (4S, 5S) - 4 - (hidroximetil) - 5 - (4 - (2- metoxietoxi) fenil) oxazolidin- 2- ona y TBDMS- Cl, para proporcionar después de la purificación mediante cromatografía en columna (utilizando EtOAc en heptano de 5% a 50%) intermediario 11 como un aceite de color amarillo claro. TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.26; t_R = 1.28 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 382.2; R_t 1.17 min; (LCMS Método 2); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.30 (d, 2H), 6.97 (d, 2H), 5.44 (br s, 1H), 5.23 (d, 1H), 4.18 (dd, 2H), 3.70- 3.85 (m, 5H), 3.48 (s, 3H), 0.91 (s, 9H), 0.11 (s, 6H).

Intermediario 12: (4S,5S)- 5- (4- (2- ((ter- butildimetilsilil)oxi)etoxi)fenil)- 4- (((ter- butildimetilsilil)oxi)metil)oxazolidin- 2- ona



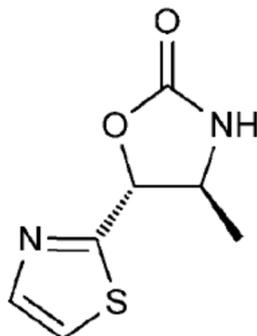
20 El compuesto del título se preparó de forma análoga al procedimiento descrito para el intermediario 11 comenzando con (R)- 2 - ((ter- butoxicarbonil) amino) - 3 - (4- hidroxifenil) propanoato de metilo y (2- bromoetoxi) (ter- butil) dimetilsilano. TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.51; t_R = 1.764 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 482; R_t 1.57 min; (LCMS Método 1); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.31 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 5.26 (br s, 1H), 5.22 (d, 1H), 4.13 (m, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.79 (m, 1H), 3.67 (m, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.92 (s, 9H), 0.11 (m, 12H).

25 Intermediario 13: (4S,5S)- 4- (((ter- butildimetilsilil)oxi)metil)- 5- (4- (3- ((ter- butildimetilsilil)oxi)propoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona



30 El compuesto del título se preparó de forma análoga al procedimiento descrito para el intermediario 12 comenzando con (R)-2 - ((ter- butoxicarbonil) amino) - 3 - (4- hidroxifenil) propanoato de metilo y (3- bromopropoxi) (ter- butil) dimetilsilano. TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.49; t_R = 1.832 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 496; R_t 1.62 min (Método LC- MS 1); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.30 (d, 2H), 6.95 (d, 2H), 5.27 (br s, 1H), 5.22 (d, 1H), 4.13 (dd, 2H), 4.00 (m, 2H), 3.80 (m, 3H), 3.74 (m, 2H), 2.01 (m, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.10 (s, 6H), 0.06 (s, 6H).

Intermediario 14: (4S, 5R)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona



a) éster ter- butílico del ácido (2- hidroxi- 1- metil- 2- tiazol- 2- il- etil)- carbámico

Se disolvió Boc- L- alanil (9.99 g, 57.7 milimoles) en 200 ml de CH_2Cl_2 . Se añadió 2 - (trimetilsilil)- tiazol (9.90 g, 62.9 milimoles) disuelto en 70 ml de CH_2Cl_2 a la mezcla de reacción a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de argón. Después de 21 horas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, la mezcla de reacción se concentró. Luego el residuo se disolvió en 180 ml de THF, cuando se añadió TBAF (1M en THF, 63.4 ml, 63.4 milimoles), y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (120 g de SiO_2) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título como una mezcla de diastereoisómeros (14.0 g, 93%). LC- MS: $[\text{M}+\text{H}]$ 259.2; R_t 0.78 min; (LCMS Método 1).

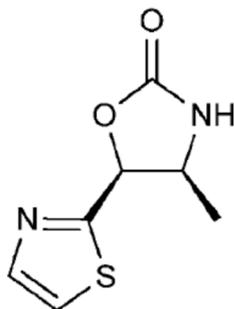
b) 2- amino- 1- tiazol- 2- il- propan- 1- ol

Éster ter- butílico del ácido 2- hidroxi- 1- metil- 2- tiazol- 2- il- etil)- carbámico (13.8 g, 53.4 milimoles) se disolvió en 50 ml de dioxano. Se añadió 134 ml (534 milimoles) de HCl 4 M en dioxano, y la mezcla de reacción se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se diluyó con éter dietílico y se filtró con el fin de obtener el compuesto del título como una sal blanca como una mezcla de diastereoisómeros (11.5 g, 92%). LC- MS: $[\text{M}+\text{H}]$ 159.1; R_t 0.22 min; (LCMS Método 1).

c) (4S, 5R)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona

Una mezcla de diastereoisómeros de 2- amino- 1- tiazol- 2- il- propan- 1- ol (4.20 g, 18.2 milimoles) se disolvió en 160 ml de CH_2Cl_2 . Se añadió diisopropilamina (11.1 ml, 63.6 milimoles) se añadió a $0\text{ }^\circ\text{C}$, seguido de trifosgeno (2.70 g, 9.09 milimoles) disuelto en 40 ml de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se diluyó con CH_2Cl_2 . Los solventes orgánicos se separaron, se lavaron con NaHCO_3 acuoso y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (80 g de SiO_2) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título en forma de un único enantiómero (2.16 g, 64%). LC- MS: $[\text{M}+\text{H}]$ 185.3; R_t 0.45 min; (LCMS Método 1). ^1H RMN (400 MHz, CHCl_3 - d): 7.75 (d, 1H), 7.35 (d, 1H), 5.60 (br s, 1H), 5.32 (d, 1H), 4.18- 4.9 (m, 1H), 1.45 (d, 3H).

Intermediario 15: (4S, 5S)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona

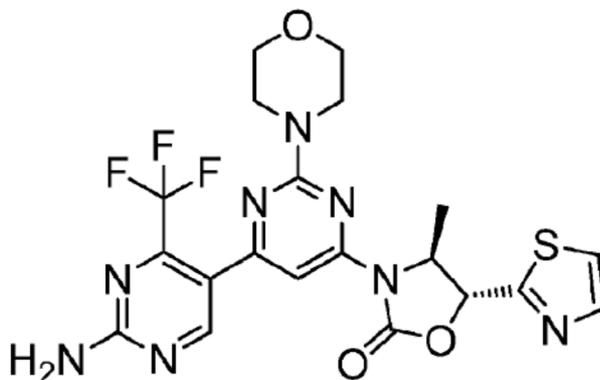


A una mezcla de (1S,2S)- 2- amino- 1- tiazol- 2- il- propan- 1- ol y (1R,2S)- 2- amino- 1- tiazol- 2- il- propan- 1- ol (2.9 g, 12.5 milimoles) en CH_2Cl_2 (40 ml) se le añadió en atmósfera de argón NEt_3 (10.5 ml, 75 milimoles) a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Luego, se añadió lentamente trifosgeno (1.86 g, 6.27 milimoles) disuelto en 40 ml de CH_2Cl_2 , y la temperatura se dejó calentar desde $0\text{ }^\circ\text{C}$ a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente. Luego la mezcla de reacción se apagó mediante la adición de NaHCO_3 acuoso. Las capas orgánicas se separaron, se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 0% a 100% con el fin de proporcionar el producto deseado (330 mg, 13%). LC- MS: $[\text{M}+\text{H}]$ 185.0; R_t 0.48 min; (LCMS Método 1). ^1H RMN (400 MHz, CHCl_3 - d): 7.79 (d, 1H), 7.34 (d, 1H), 5.91 (d, 1H), 5.71 (br

s, 1H), 4.48- 4.38 (m, 1H), 0.89 (d, 3H).

Síntesis de los compuestos de Ejemplo

Ejemplo 1: (4S,5R)- 3- (2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona



5

a) (4S, 5R) - 3 - (6- Cloro- 2- morfolin- 4- il- pirimidin- 4- il)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona

(4S, 5R)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona (intermediario 14) (4.70 g, 20.1 milimoles) se disolvió en 70 ml de DMF y se enfrió a 0 °C. NaH (964 mg, 60% en aceite, 24.1 milimoles) se añadió en atmósfera de argón, y la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a 0 °C. 4 - (4,6- dicloropirimidin- 2- il) se añadió morfolina (3.70 g, 20.1 milimoles) disuelto en 30 ml de DMF, y la mezcla de reacción se agitó durante 3 horas a 0 °C, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. Luego la reacción se apagó mediante la adición de NH₄Cl acuoso, seguido de dilución con EtOAc, los solventes orgánicos se separaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (80 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar el compuesto del título (3.64 g, 48%). LC- MS: [M+H] 382.2, 384.1; R_t 1.10 min; (LCMS Método 1). ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 7.77 (d, 1H), 7.38- 7.33 (m, 2H), 5.39 (d, 1H), 5.07- 4.98 (m, 1H), 3.75- 3.55 (m, 8H), 1.64 (d, 3H).

10

15

b) (4S,5R)- 3- (2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4,5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona

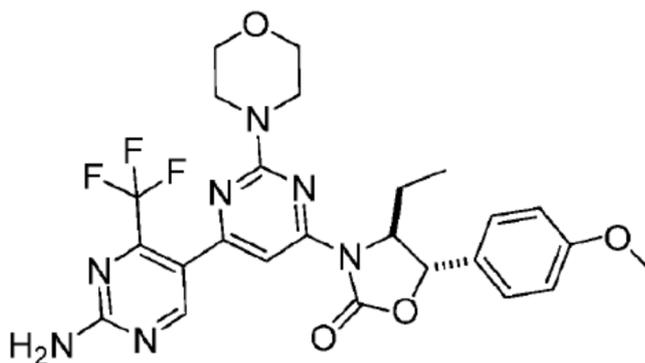
A una solución de (4S, 5R) - 3 - (6- cloro- 2- morfolin- 4- il- pirimidin- 4- il)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona obtenida en el paso a) (1.30 g, 3.40 milimoles) en 20 ml de dimetoxietano se añadió en atmósfera de argón 5 - (4,4,5,5- tetrametil- 1, 3,2- dioxaborolan- 2- il) - 4 - (trifluorometil) pirimidin- 2- amina (1.08 g, 3.75 milimoles), PdCl₂ (dppf)- CH₂Cl₂ (214 mg, 262 milimoles), y carbonato sódico acuoso 2 M (5.11 ml, 10.2 milimoles). La mezcla de reacción se agitó a 80 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó con 80 ml de EtOAc, los solventes orgánicos se lavaron con NH₄Cl acuoso y salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron, y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (80 g de SiO₂) usando EtOAc en hexano de 0% a 100% con el fin de proporcionar ejemplo 1 como un sólido amorfo (1.20 g, 69%). LC- MS: [M+H] 509.0; R_t 0.99 min; (LCMS Método 1). ¹H RMN (400 MHz, DMSO- d₆): 8.58 (s, 1H), 7.92 (d, 1H), 7.87 (d, 1H), 7.64 (br s, 2H), 7.41 (s, 1H), 5.89 (d, 1H), 5.10 - 5.4 (m, 1H), 3.75- 3.55 (m, 8H), 1.62 (d, 3H).

20

25

Ejemplo 2: (4S*,5S*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona

30



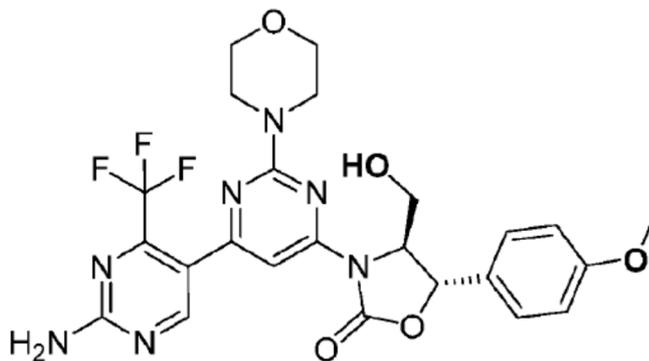
a) (4S*, 5S*) - 3 - (6- cloro- 2- morfolinopirimidin- 4- il)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona

A una solución de (4R*, 5R*) - 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona (intermediario 2) (217 mg, 0.98 milimoles) en DMF (2 ml) se añadió a temperatura ambiente en atmósfera de argón NaH (51.4 mg, 1.18 milimoles). Después de 20 minutos, se añadió una suspensión de 4 - (4,6- dicloropirimidin- 2- il) morfolina (230 mg, 0.98 milimoles en DMF (1 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 85 °C durante 20 minutos. La solución se enfrió a 0 °C con NH₄Cl acuoso, se extrajo con acetato de etilo, y las capas orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando EtOAc en hexano de 0% a 20% con el fin de proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido blanco (375 mg, 91%) LC- MS: [M+H] 419.1; Rt 1.26 min; (LCMS método 1).

b) (4S*,5S*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipyrimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona

A una solución de (4R*, 5R*) - 3 - (6- cloro- 2- morfolinopirimidin- 4- il)- 4- etil- 5- (4- metoxi- fenil) oxazolidin- 2- ona obtenido en el paso a) en DME (2 ml) se añadió a temperatura ambiente en atmósfera de argón 5 - (4,4,5,5- tetrametil- 1, 3,2- dioxaborolan- 2- il) - 4 - (trifluorometil) pirimidin- 2- amina (76 mg, 0.26 milimoles), una solución acuosa 2M de Na₂CO₃ (0.36 ml, 0.72 milimoles) y tetraquis(trifenilfosfina)paladio (27.6 mg, 24 milimoles). La mezcla se agitó a 80 °C durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando EtOAc en hexano de 0% a 20% con el fin de proporcionar el compuesto del título (125 mg, 95%) como un aceite de color amarillo. LC- MS: [M+H] 546.2; Rt 1.17 min; (LCMS Método 1). ¹H RMN (400 MHz, CHCl₃- d): 8.63 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.31 (d, 2H), 6.96 (d, 2H), 5.49 (br s, 2H), 5.27 (d, 1H), 4.66- 4.61 (m, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.80- 3.73 (m, 8H), 2.30- 2.00 (m, 2H), 1.08 (t, 3H).

Ejemplo 3: (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipyrimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona



a) (4S,5S)- 4- (((ter- Butildifenilsilil)oxi)metil)- 3- (6- cloro- 2- morfolinopirimidin- 4- il)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona

A una solución de (4S, 5S) - 4 - (((ter- butildifenilsililo) oxi) metil) - 5 - (4- metoxifenil) oxazolidin- 2- ona (compuesto intermediario 10) (1.65 g, 3.57 milimoles), 4 - (4,6- dicloropirimidin- 2- il)morfolina (920 mg, 3.93 milimoles) y Cs₂CO₃ (1.75 g, 5.36 milimoles) en dioxano (20 ml) se añadió después de la purga con argón 4,5- bis (difenilfosfina) - 9,9- dimetilxanteno (145 mg, 250 milimoles) y Pd₂(dba)₃ (65 mg, 0.071 milimoles), y la mezcla de reacción se calentó durante 5 horas a 100 °C. La mezcla de reacción se añadió a solución acuosa de NaHCO₃ al 10% y se extrajo con EtOAc. Los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 0% al 50% con el fin de proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (2.33 g, 94%). TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.52; LC- MS: [M+H] 659 661; Rt 1.58 min; (LCMS método 2). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): 7.64 (m, 4H), 7.54 (s, 1H), 7.55- 7.35 (m, 6H), 7.26 (m, 2H), 6.95 (d, 2H), 5.21 (d, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.22 (dd, 1H), 3.96 (dd, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.60- 3.40 (m, 8H), 1.09 (s, 9H).

b) (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- bipyrimidin]- 6- il)- 4- (((ter- butildifenilsilil)oxi)metil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona

Una solución de (4S,5S)- 4- (((ter- butildifenilsilil)oxi)metil)- 3- (6- cloro- 2- morfolinopirimidin- 4- il)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona obtenido en el paso a) (150 mg, 228 μmol), 5 - (4,4,5,5- tetrametil- 1, 3,2- dioxaborolan- 2- il) - 4 - (trifluorometil) pirimidin- 2- amina (108 mg, 364 μmol), 20% de Na₂CO₃ acuoso (0.24 ml, 2.28 milimoles), y PdCl₂ (dppf)- CH₂Cl₂ (18.6 mg, 23 milimoles) en DME (2 ml) en atmósfera de argón se agitó a 80 °C durante 8 h . La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con solución saturada de NaHCO₃, H₂O y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando EtOAc en heptano del 0% a 33% con el fin de proporcionar el compuesto del título como una espuma de color amarillo claro (68 mg, 28%); TLC (heptano/EtOAc 1:1) R_f = 0.32; t_R = 1.663 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 786; Rt 1.48 min; (LCMS método 2).

c) (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- biperimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona

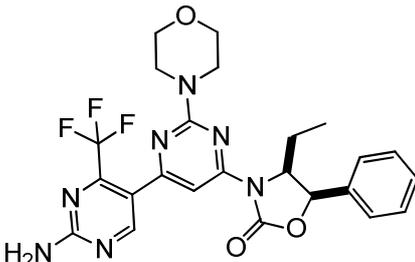
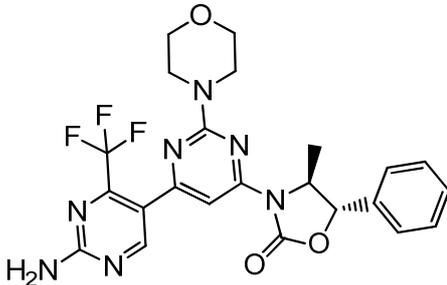
5 A una solución de (4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4,5'- biperimidin]- 6- il)- 4- (((ter- butildifenilsilil)oxi)metil)- 5- (4- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona obtenido en el paso b) (68 mg, 65 milimoles) en THF (2 ml) se añadió por goteo a 0 °C TBAF 1 M en THF (0.05 ml, 0.05 milimoles), y la mezcla resultante se agitó durante 30 min a 0 °C y 1 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna usando una relación de hexane/CH₂Cl₂/MeOH de 100:100:5 a 0:100:5, seguido por HPLC preparativa (Waters Sun Fire C18, 30 x 100 mm, 5 µm; 0.1% TFA- agua/acetonitrilo; gradiente de acetonitrilo 30- 50% en 20 min) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (18 mg, 50%); TLC (CH₂Cl₂/MeOH 19:1) R_f = 0.40; t_R = 0.998 min (UPLC 1); LC- MS: [M+H] 548; Rt 0.96 min; (LCMS método 2). ¹H RMN (600 MHz, DMSO- d₆): 8.60 (s, 1H), 7.64 (br s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.34 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.58 (d, 1H), 5.32 (t, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.75- 3.55 (m, 8H).

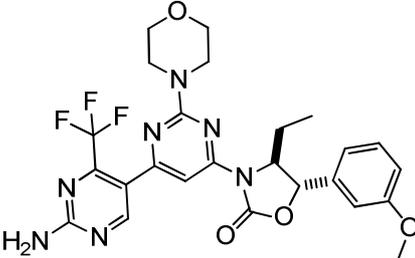
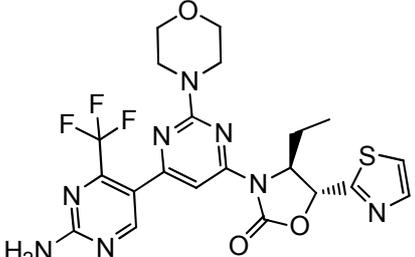
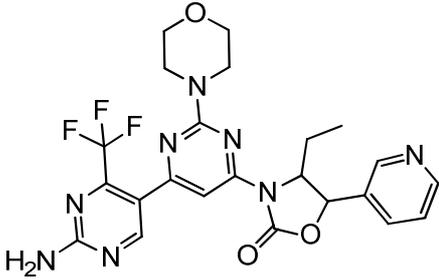
10

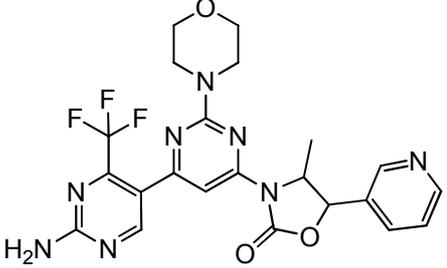
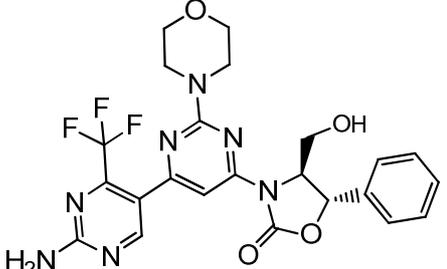
Ejemplos 4 a 14

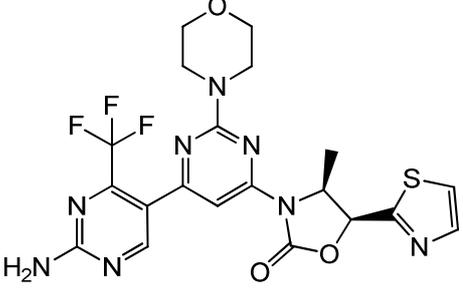
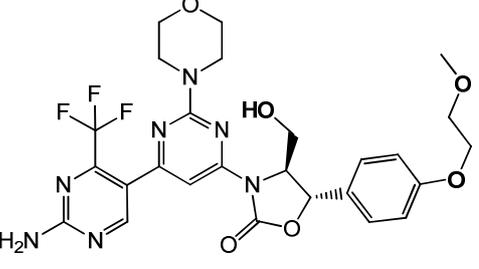
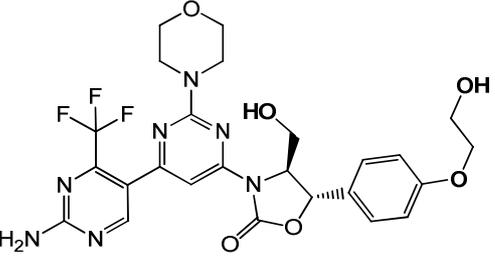
15 Ejemplos 4 a 14 de la Tabla 1 a continuación se pueden realizar utilizando procedimientos análogos a los descritos en los ejemplos 1- 3, utilizando el intermediario apropiado de éster borónico y oxazolidinona.

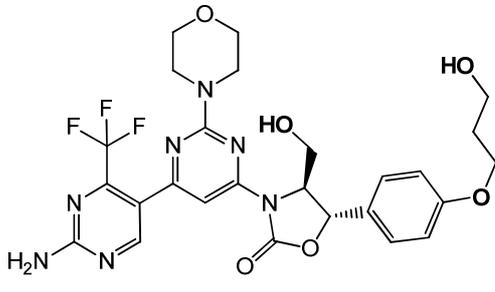
Tabla 1

| Ejemplo No. | Estructura y Nombre | ¹ H RMN | LC/MS |
|-------------|--|---|--|
| 4 |  <p>(4S*.5R*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- biperimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- feniloxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (400 MHz. CHCl ₃ - d): 8.64 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.39- 7.50 (m, 5H), 5.82 (d, 1H), 5.46 (br s, 2H), 5.02- 4.96 (m, 1H), 3.87- 3.73 (m, 8H), 1.84- 1.72 (m, 1H), 1.59- 1.66 (m, 1H), 0.52 (t, 3H). | LCMS (método 2): Tiempo de retención: 1.19 min Masa [M+H]: 516.2 |
| 5 |  <p>(4S.5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- biperimidin]- 6- il)- 4- metil- 5- feniloxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (600 MHz. DMSO- d ₆): 8.61 (s, 1H), 7.64 (br s, 2H), 7.51- 7.35 (m, 6H), 5.45 (d, 1H), 4.73- 4.52 (m, 1H), 3.78- 3.54 (m, 8H), 1.61 (d, 3H). | LCMS (método 2): Tiempo de retención: 1.11 min Masas (ES +): 502.2 |

| Ejemplo No. | Estructura y Nombre | ¹ H RMN | LC/MS |
|-------------|--|---|--|
| 6 |  <p>(4R*.5R*)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (3- metoxifenil)oxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (400 MHz. CHCl ₃ - d): 8.62 (s, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.32- 7.40 (t, 1H), 7.01- 6.86 (m, 3H), 5.50 (br s, 2H), 5.29 (d, 1H), 4.60- 4.64 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.76 (m, 8H), 2.30- 2.00 (m, 2H), 1.11 (t, 3H). | LCMS (método 2): Tiempo de retención: 1.18 min Masa [M+H]: 546.2 |
| 7 |  <p>(4S.5R)- 3- (2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- etil- 5- (tiazol- 2- il)oxazolidin- 2- ona</p> | | LCMS (método 1): Tiempo de retención: 1.06 min Masa [M+H]: 523.1 |
| 8 |  <p>(2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4.5']bipirimidinil- 6- il)- 4- etil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona</p> | | LCMS (método 1): Tiempo de retención: 0.96 min Masa [M+H]: 517.5 |

| Ejemplo No. | Estructura y Nombre | ¹ H RMN | LC/MS |
|-------------|---|---|---|
| 9 |  <p data-bbox="391 705 901 795">3- (2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4.5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil- 5- piridin- 3- il- oxazolidin- 2- ona</p> | <p data-bbox="957 358 1204 470">Mezcla de diastereoisómeros cis y trans en una proporción de 2 a 1:</p> <p data-bbox="957 492 1204 795">diastereoisómero cis: ¹H RMN (400 MHz.DMSO- d₆): 8.78- 8.58 (m, 3H), 7.96- 7.88 (m, 1H), 7.62 (s ancho. 2H), 7.54- 7.48 (m, 2H), 6.05 (d, 1H), 5.27- 5.20 (m, 1H), 3.78- 3.62 (m, 8H), 0.95 (d, 3H)</p> <p data-bbox="957 817 1204 1120">diastereoisómero trans: ¹H RMN (400 MHz. DMSO- d₆): 8.78- 8.58 (m, 3H), 7.96- 7.88 (m, 1H), 7.62 (br s, 2H), 7.54- 7.48 (m, 1H), 7.45 (s, 1H), 5.53 (d . 1H), 4.77- 4.70 (m, 1H), 3.78- 3.62 (m, 8H), 1.62 (d, 3H)</p> | <p data-bbox="1220 358 1377 414">LCMS (método 1):</p> <p data-bbox="1220 436 1377 515">Tiempo de retención: 0.91 min</p> <p data-bbox="1220 537 1377 616">Masa [M+H]: 503.2</p> |
| 10 |  <p data-bbox="391 1489 901 1579">(4S,5S)- 3- (2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4.5']bipirimidinil- 6- il)- 4- hidroximetil- 5- fenil- oxazolidin- 2- ona</p> | <p data-bbox="957 1153 1204 1433">¹H RMN (400 MHz. DMSO- d₆): 8.61 (s, 1H), 7.61 (br s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.50- 7.31 (m, 5H), 5.65 (d, 1H), 5.34 (t, 1H), 4.66- 4.59 (m, 1H), 4.08- 3.96 (m, 1H), 3.92- 3.83 (m, 1H), 3.73- 3.57 (m, 8H).</p> | <p data-bbox="1220 1153 1377 1209">LCMS (método 2):</p> <p data-bbox="1220 1232 1377 1310">Tiempo de retención: 0.97 min</p> <p data-bbox="1220 1332 1377 1411">Masa [M+H]: 518.1</p> |

| Ejemplo No. | Estructura y Nombre | ¹ H RMN | LC/MS |
|-------------|---|--|--|
| 11 |  <p>(4S,5S)-3-(2'- amino- 2- morfolin- 4- il- 4'- trifluorometil- [4.5']bipirimidinil- 6- il)- 4- metil- 5- tiazol- 2- il- oxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (400 MHz. DMSO- d): 8.60 (s, 1H), 7.98 (d, 1H), 7.89 (d, 1H), 7.64 (br s, 2H), 7.44 (s, 1H), 6.28 (d, 1H), 5.30-5.20 (m, 1H), 3.78-3.61 (m, 8H), 1.05 (d, 3H). | LCMS (método 1): Tiempo de retención: 1.01 min Masa [M+H]: 509.2 |
| 12 |  <p>(4S,5S)-3-(2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- bipirimidin]- 6- il)- 4- (hidroximetil)- 5- (4- (2- metoxietoxi)fenil)oxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (600 MHz. DMSO- d ₆): 8.53 (s, 1H), 7.64 (s ancho, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.32 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.58 (d, 1H), 5.32 (t, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.09 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.55-3.75 (m, 10H); 3.34 (s, 3H). | LCMS (método 2): Tiempo de retención: 0.93 min Masa [M+H]: 592.1 |
| 13 |  <p>(4S,5S)-3-(2'- amino- 2- morfolino- 4'- (trifluorometil)- [4.5'- bipirimidin]- 6- il)- 5- (4- (2- hidroxietoxi)fenil)- 4- (hidroximetil)oxazolidin- 2- ona</p> | ¹ H RMN (400 MHz. DMSO- d ₆): 8.61 (s, 1H), 7.63 (br s, 2H), 7.54 (s, 1H), 7.33 (d, 2H), 7.02 (d, 2H), 5.58 (d, 1H), 5.31 (t, 1H), 4.87 (t, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.10-3.90 (m, 3H), 3.82 (m, 1H), 3.75-3.55 (m, 10H). | LCMS (método 1): Tiempo de retención: 0.79 min Masa [M+H]: 578.2 |

| Ejemplo No. | Estructura y Nombre | ¹ H RMN | LC/MS |
|-------------|---|---|--|
| 14 |  <p>(4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolino-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-(4-(3-hidroxiopropoxi)fenil)oxazolidin-2-ona</p> | ¹ H RMN (400 MHz, DMSO- d ₆): 8.60 (s, 1H), 7.62 (br s, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.31 (d, 2H), 7.00 (d, 2H), 5.57 (d, 1H), 5.30 (t, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.53 (t, 1H), 4.04 (m, 2H), 3.99 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.63 (m, 8H), 3.55 (m, 2H), 1.85 (m, 2H), | LCMS (método 1): Tiempo de retención: 0.84 min Masa [M+H]: 592.3 |

Actividad biológica

La actividad de un compuesto de acuerdo con la presente invención se puede evaluar mediante los siguientes métodos in vitro y en vivo

5 Preparación de las diluciones del compuesto (384 pozos)

Los compuestos de ensayo se disolvieron en DMSO (10 mM) y se transfirieron a tubos en forma de V de fondo plano de 1.4 ml que llevan un chip único de matriz 2D por cada juego de compuestos individuales de Novartis. El número de estos chips fue vinculado claramente con los números de NovartisPharma. Las soluciones madre se almacenaron a -20 ° C cuando no fueron utilizadas inmediatamente. Para el procedimiento de prueba de los viales, se descongelaron y se identificaron mediante un escáner gracias al cual se generó una hoja de trabajo que guió los siguientes pasos de trabajo.

Los compuestos se diluyeron ya sea manualmente en DMSO para experimentos individuales (96 pozos que permiten 10 compuestos a 8 concentraciones (puntos individuales)) como se describe, o fueron preparados como se describe a continuación en caso de que la prueba se hiciera para perfilar en 384 pozos. Este formato permitió el ensayo de un máximo de 40 compuestos de prueba individuales a 8 concentraciones (puntos individuales), incluyendo a 4 compuestos de referencia. El protocolo de dilución incluye la producción de "placas de pre-dilución", "placas maestras" y "placas de ensayo".

Placas de Pre-dilución: Se utilizaron placas de polipropileno de 96 pozos como placas de pre-dilución. Se preparó un total de 4 placas de pre-dilución incluyendo a los 10 compuestos de prueba cada uno en las posiciones de la placa A1-A10, un compuesto estándar en A11 y un control de DMSO en A12. El patrón de las etapas de dilución se resume en la Tabla 1. Se han escrito programas para ejecutar estos pasos de pipeteado en los robots HamiltonSTAR.

Tabla 1 Patrón de dilución de las placas de pre-dilución

| c | Vol (μl) | Conc. (μM) | Vol (μl) DMSO | Vol (μl) | Conc. (μM) | Proporción de dil. | Concentración final (μM) |
|---|----------|------------|---------------|----------|------------|--------------------|--------------------------|
| A | 30 | 10'000 | + 135 | → 165 | 1'820 | 1:5.5 | 10 |
| B | 50 | 1'820 | + 116 | → 166 | 546 | 1:3.33 | 3 |
| C | 50 | 546 | + 100 | → 150 | 182 | 1:3 | 1 |
| D | 50 | 182 | + 116 | → 166 | 54.6 | 1:3.33 | 0.3 |
| E | 50 | 54.6 | + 100 | → 150 | 18.2 | 1:3 | 0.1 |
| F | 50 | 18.2 | + 116 | → 166 | 5.46 | 1:3.33 | 0.03 |

ES 2 641 820 T3

| c | Vol (µl) | Conc. (µM) | | Vol (µl) DMSO | | Vol (µl) | Conc. (µM) | Proporción de dil. | Concentración final (µM) |
|---|----------|------------|---|---------------|---|----------|------------|--------------------|--------------------------|
| G | 50 | 5.46 | + | 100 | → | 150 | 1.82 | 1:3 | 0.01 |
| H | 50 | 1.82 | + | 116 | → | 166 | 0.546 | 1:3.33 | 0.003 |

El DMSO se saturó con H₂O hasta una concentración de 10%. Vol.: Volumen, Conc.: Concentración, Proporción de Dil.: Relación de dilución, Concentración final: concentración final.

5 Placas Maestras: se transfirieron 100µL de las diluciones de los compuestos individuales, incluyendo al compuesto estándar y a los controles de las 4 "placas de pre-dilución" a una "placa principal" 384 incluyendo las siguientes concentraciones de 1'820, 564, 182, 54.6, 18.2, 5.46, 1.82 y 0.546 µM, respectivamente, en DMSO al 90%.

10 Placas de ensayo: Se prepararon "Placas de ensayo" idénticas mediante el pipeteo de 50nL de cada una de las diluciones de los compuestos de las "placas maestras" en "placas de ensayo" 384. Los compuestos se mezclaron con 4.5µL de los componentes de los ensayos más 4.5µL de la enzima correspondiente a una dilución 1:181 permitiendo la concentración final de 10, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.03, 0.01 y 0.003 mM, respectivamente. La preparación de las "placas maestras" estuvo a cargo del robot Matriz PlateMate Plus y la repetición de las "placas de ensayo" por el robot HummingBird.

Método para generar las construcciones de expresión

15 Se clonaron, expresaron y purificaron a las PI3K α , PI3K β , PI3K δ y mTORhumanas activas catalíticamente como se describe (Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, de Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C (2008), *Mol Cancer Ther.* 7:1851-63 and Maira SM, Pecchi S, Brueggen J, Huh K, Schnell C, Fritsch C, Nagel T, Wiesmann M, Brachmann S, Dorsch M, Chène P, Schoemaker K, De Pover A, Menezes D, Fabbro D, Sellers W, García-Echeverría C, Voliva CF (2011), *Mol. Cancer Ther.* accepted).

20 Ensayos bioquímicos para PI3Kalfa, PI3Kbeta

25 El reactivo KinaseGlo para la prueba de luminiscencia basada en la detección de ATP se obtuvo de Promega, (N ° V6714, Lote N ° 236.161) a través Catalys, Wallisellen, Suiza (L-alfa-fosfatidilinositol (PI), de hígado, de bovino) se obtuvieron de Avanti Polar Lipid (Cat. N ° 840042C, Lote # LPI-274), el fosfatidilinositol-4 ,5-bisfosfato (PIP (4,5) 2 (Avanti, Cat. N ° 840046X) o el L- α -fosfatidilinositol (PI) se obtuvieron de Avanti Polar Lipid (Cat. N ° 840042C, Lote # LPI-274). El L- α -fosfatidilserina (PS) era de Avanti Polar Lipid (Cat. N ° 840032C), el lípido polar n-octil-glucósido Avanti (Cat. No. 10634425001). La luminiscencia es una lectura bien fundamentada para determinar las concentraciones de ATP y por lo tanto se puede utilizar para seguir la actividad de muchas cinasas independientemente de su sustrato. El ensayo de cinasa CinasaGloLuminescent (Promega, Madison/WI, EE.UU.) es un método HTS homogéneo de medir la actividad cinasa mediante la cuantificación de la cantidad de ATP que permanece en solución después de una

30 reacción de la cinasa. Se distribuyeron 50nl de las diluciones del compuesto sobre placas negras de estireno no vinculantes de 384 pozos de bajo volumen (NBS) (Costar Cat. No. NBS # 3676) tal como se describe en la sección 8.2. El L- α -fosfatidilinositol (PI), fue proporcionado como una solución de 10 mg/ml en metanol, se transfirió a un tubo de vidrio y se secó al haz de nitrógeno. A continuación, se resuspendió en octilglucósido al 3% por agitación y se almacenó a 4 °C. Se añadieron 35 5 µl de una mezcla de PI/OG con los subtipos PI3K α y PI3K β . Las reacciones de cinasa se iniciaron mediante la adición de 5 µl de una mezcla de ATP que contiene un volumen final de 10 µl de TRIS-HCl 10 mM, a pH de 7.5, MgCl₂ 3 mM, NaCl 50 mM, CHAPS al 0.05%, DTT 1 mM y ATP 1 mM, y se produjo a temperatura ambiente. Las reacciones se detuvieron con 10 µl de KinaseGlo y las placas fueron leídas 10 minutos más tarde en un lector de Synergy2 usando un tiempo de integración de 0.1 segundos por pozo. se añadió NVP-BGT226 a una concentración de 2.5 M (estándar) 40 a las placas de ensayo para generar el 100% de inhibición de la reacción de la cinasa, y el 0% de inhibición fue dado por el vehículo disolvente (90% de DMSO en agua). El NVP-BGT226 se utilizó como compuesto de referencia y se incluyó en todas las placas de ensayo en forma de una dilución de 16 puntos por duplicado.

45 Los valores de IC₅₀ de la inhibición porcentual de cada compuesto a 8 concentraciones (por lo general 10, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.030, 0.010 y 0.003 M) n = 2 se derivaron mediante una curva sigmoidal de ajuste de dosis-respuesta a una gráfica de la lectura del ensayo sobre la concentración del inhibidor como se describe. Todos los ajustes se realizaron con el programa XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, Reino Unido).

Ensayos bioquímicos para PI3Kdelta, PI3Kgamma

El Kit de ensayo universal de cinasa TR-FRET Adapta™ fue adquirido a Invitrogen Corporation (Carlsbad/CA, EE.UU.) (art. PV5099). El kit contiene los siguientes reactivos: Anticuerpo Adapta Eu-anti-ADP (Anticuerpo anti-ADP marcado

con europio en solución salina amortiguadora de HEPES, Cat. No. PV5097), Alexa Fluor® 647 marcado con un trazador de ADP (Alexa Fluor® 647 marcada con trazador de ADP en solución salina amortiguadora de HEPES, cat. No. PV5098), amortiguador de disolución TR-FRET pH 7.5 patentado (art. PV3574).

5 El sustrato Fosfatidilinositol de PIK3CD se obtuvo de Invitrogen (vesículas que constan de PI 2 mM en HEPES 50 mM pH 7.5; Cat. No. PV5371). El sustrato fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato de PIK3CG (PIP (4,5) 2 se obtuvo de Invitrogen (PIP2: PS vesículas grandes unilamelares que consisten en 1 mM PIP2: 19mM PS en HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 3 mM, EGTA 1 mM, cat. N° PV5100).

10 La tecnología de resonancia de fluorescencia de transferencia de energía resuelta en el tiempo (TR-FRET) es una tecnología basada en la transferencia de energía entre dos colorantes adyacentes, a partir de un electrón excitado lanzado como un fotón a continuación en un colorante (el donante) a un electrón de un colorante adyacente (el aceptor) a través de la resonancia, Esta transferencia de energía es detectada por un aumento en la emisión de fluorescencia del aceptor, y por una disminución en la emisión de fluorescencia del donante. Los ensayos de TR-FRET para proteínas cinasas utilizan un lantánido de terbio de largo tiempo de vida o quelatos de europio como la especie donante que supera la interferencia de la autofluorescencia del compuesto o la dispersión de la luz a partir de los compuestos precipitados, mediante la introducción de un retardo después de la excitación por una fuente de excitación de la lámpara de destellos. Los resultados se expresan a menudo como una relación de las intensidades de los fluoróforos del aceptor y del donante. La naturaleza radiométrica de tal valor corrige las diferencias en los volúmenes entre los pozos del ensayo, así como corrige los efectos del enfriamiento debidos a los compuestos coloreados. El ensayo Adapta™ se puede dividir en dos fases: una fase de reacción de la cinasa y una fase de detección de ADP. En la fase de reacción de la cinasa, se añaden todos los componentes de la reacción cinasa al pozo y la reacción se deja incubar durante un período de tiempo específico para cada cinasa. Después de la reacción, una solución de detección de un anticuerpo anti-ADP marcado con Eu, Alexa Fluor® 647 marcada con un trazador de ADP, y EDTA (para detener la reacción de la cinasa) se añaden a los pozos de ensayo. El ADP formado por la reacción de la cinasa desplazará al Alexa Fluor® 647 marcada con un trazador de ADP a partir del anticuerpo, lo que resulta en una disminución de la señal TR-FRET. En presencia de un inhibidor, se reduce la cantidad de ADP formado por la reacción de la cinasa, y la interacción intacta entre el anticuerpo-trazador resultante mantiene una señal alta de TR-FRET. En el ensayo Adapta™, el donante (anticuerpo europio-anti-ADP) se excita a 340 nm y transfiere su energía al aceptor (Alexa Fluor® 647 marcada con trazador de ADP). La emisión del Alexa Fluor® 647 se puede controlar con un filtro centrado a 665 nm, ya que se encuentra entre los picos de emisión del donante, que se mide a 615/620 nm.

15 Se dispensaron 50 nl de las diluciones de los compuestos en placas blancas de poliestireno de pequeño volumen de 384 pozos, como se describe en el apartado 2.2. A continuación, se incuban 5 µl de PI3Kg y PI3Kd y de sustrato lipídico (PI o PIP2: PS), seguido de 5 µl de ATP (volumen de ensayo final de 10 µl) a temperatura ambiente. El amortiguador de la reacción estándar para el ensayo de TR-FRET Adapta™ contenía Tris-HCl 10 mM pH 7.5, MgCl₂ 3 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, CHAPS al 0.05%. Las reacciones se detuvieron con 5 µl de una mezcla de EDTA que contiene el anticuerpo anti-ADP marcado con Eu y el Alexa Fluor® 647 marcada con un trazador de ADP en un amortiguador de dilución de TR-FRET (propiedad de IVG). Se leen las placas 15 a 60 minutos más tarde en un lector de Synergy2 usando un tiempo de integración de 0.4 segundos y un retraso de 0.05 segundos. El control para el 100% de inhibición de la reacción de la cinasa se realizó mediante la sustitución de la PI3K por el amortiguador de reacción estándar. El control de la inhibición del 0% fue dado por el vehículo disolvente de los compuestos (90% DMSO en H₂O). El compuesto estándar de NVP-BGT226 se utilizó como compuesto de referencia y se incluyó en todas las placas de ensayo en forma de una dilución de 16 puntos por duplicado.

20 Los datos se analizaron utilizando el software de ajuste Excel o GraphpadPrism. Los valores de CE₅₀ se derivaron mediante una curva sigmoïdal de ajuste de dosis-respuesta a una gráfica de la lectura del ensayo sobre la concentración del inhibidor. Todos los ajustes se realizaron con el programa XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, Reino Unido). La determinación de los valores de CE₅₀ del porcentaje de inhibición de cada compuesto a 8 concentraciones (por lo general 10, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.030, 0.010 y 0.003 M) n = 2 se obtuvieron por una curva sigmoïdal de ajuste dosis-respuesta a una gráfica de lectura del ensayo sobre la concentración del inhibidor. Todos los ajustes se realizaron con el programa XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, Reino Unido).

Ensayo bioquímico para mTOR

25 Los ensayos TR-FRET para proteínas cinasas utilizan terbio, un lantánido de largo tiempo de vida o quelatos de europio como la especie donante que superan la interferencia por autofluorescencia del compuesto o por dispersión de la luz a partir de los compuestos precipitados, mediante la introducción de un retardo después de la excitación por una fuente de excitación de la lámpara de destellos. Los resultados se expresan a menudo como una relación de las intensidades de los fluoróforos del aceptor y del donante. La naturaleza radiométrica de tal valor corrige las diferencias en los volúmenes entre los pozos de ensayo, así como corrige los efectos del enfriamiento debido a los compuestos coloreados.

30 Los ensayos de unión se basan en la unión y el desplazamiento de inhibidores de cinasa etiquetados con Alexa Fluor® 647 ATP-competitivos, para la cinasa de interés. "Trazadores Cinasa" de Invitrogen se ha desarrollado para hacer frente a una amplia gama de objetivos cinasa y está basada en inhibidores ATP-competitivos de cinasa, que los hace adecuados para la detección de cualquiera de los compuestos que se unen al sitio de ATP o a un sitio alostérico para

alterar la conformación del sitio del ATP. Los inhibidores que se unen al sitio del ATP incluyen tanto inhibidores de la cinasa Tipo I, que se unen exclusivamente al sitio del ATP, y los inhibidores de tipo II (por ejemplo, Gleevec®/imatinib, sorafenib, BIRB-796), que se unen tanto al sitio del ATP y a un sitio hidrófobo expuesto en la conformación DFG-out (no activo). Los inhibidores de tipo III son compuestos que no compiten con el ATP, se refiere vagamente a estos como inhibidores alostéricos. Un estudio de 15 diversos inhibidores de tipo III demostró que todos menos un compuesto fue detectado en el ensayo de unión con una potencia equivalente a la de los ensayos de actividad. La única excepción fue un compuesto sustrato-competitivo, y por lo tanto no se trata de un inhibidor alostérico verdadero.

En contraste con la mayoría de los ensayos de actividad cinasa basados en fluorescencia, los ensayos de unión a cinasa LanthaScreen® Eu3+ pueden ser leídos de forma continua, lo que facilita la evaluación de los compuestos con una cinética de unión lenta. También, a diferencia de la mayoría de los ensayos de actividad, los ensayos de unión pueden realizarse usando preparaciones ya sea activos o no activadas de cinasa, lo que permite la caracterización de los compuestos que se unen preferentemente a cinasas no activadas, tales como Gleevec®/imatinib y algunos inhibidores alostéricos.

En el ensayo de unión a cinasa LanthaScreen™, el donante (anticuerpo anti-GSTEu3+-) se excita a 340 nm y transfiere su energía al aceptor (inhibidor de cinasa ATP-competitivo marcado con Alexa Fluor® 647 = Trazador-314). La emisión desde el trazador-314 (inhibidor Alexa Fluor® 647) se puede controlar con un filtro centrado a 665 nm, ya que se encuentra entre los picos de emisión del donante, que se mide a 615/620 nm. La unión de ambos, el anticuerpo anti-GST-Eu3+ y el trazador-314, a la cinasa resulta en un alto grado de FRET del fluoróforo Eu3+-donante al fluoróforo aceptor Alexa-Fluor®647- en el trazador-314. La unión de un inhibidor de la cinasa compite por la unión con el trazador, lo que resulta en una pérdida de FRET.

Se dispensaron 50 nl de las diluciones de los compuestos en placas de poliestireno de 384 pozos de pequeño volumen, como se describe en el apartado 2.2. A continuación, 5 µl de GST-mTOR y el anticuerpo europeo-anti-GST seguido de 5 µl de trazador-314 (volumen de ensayo final de 10 µl) se incuban a Temperatura Ambiente. El amortiguador de reacción estándar para el ensayo de unión LanthaScreen™ cinasa contenía HEPES 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 5 mM, EGTA 1 mM, 0.01% de Pluronic F-127. Las placas se leen 60 minutos más tarde en un lector Synergy2 con un tiempo de integración de 0.2 microsegundos y un retraso de 0.1 microsegundos.

Para calcular la relación de emisión, la señal emitida a 665 nm desde el aceptor (Alexa Fluor® 647-marcado con trazador -314) se divide por la señal emitida a 620 nm del donante (anticuerpo anti-GSTEu3+)

El control de la inhibición del 0% fue dado por el vehículo disolvente de los compuestos (90% DMSO en H₂O). el control de la inhibición relativa del 100% se realizó mediante la adición de 10 mM en la mezcla que contiene GST-mTOR y anticuerpo anti-GST con europio. Un control adicional para la inhibición absoluta 0% está dada por el anticuerpo anti-GST Eu3+ sin GST-mTOR.

Ensayos celulares para PI3Kalfa, beta y delta

La tecnología AlphaScreen (Ensayo de luminosidad Amplificada de Proximidad Homogénea, ALPHA, Perkin Elmer) es una tecnología de ensayo de proximidad basado en perlas no radiactivas para estudiar las interacciones biomoleculares en el formato de una placa de microtitulación homogénea. El nombre de marca *SureFire* denota ensayos AlphaScreen que están adaptados para cuantificar la fosforilación de las proteínas celulares endógenas en los lisados celulares, mediante el uso de pares de anticuerpos apareados, que consisten de un anticuerpo anti-fosfo-cinasa y un anticuerpo anti-cinasa. El ensayo permite la caracterización de la señalización de cinasa en las células así como la medición de los efectos inhibidores de la cinasa. La tecnología AlphaScreen proporciona varias ventajas sobre las técnicas de ensayo convencionales tales como ELISA, ya que evita procedimientos de lavado que consumen mucho tiempo así como reduce la manipulación de las placas. Además, es miniaturizable al menos a un formato de 384 pozos y proporciona una sensibilidad de hasta el rango femtomolar, lo que depende de la afinidad de los anticuerpos incluidos en el kit de ensayo individual *SureFireAlphaScreen*. La alta sensibilidad se alcanza por un mecanismo de amplificación intrínseca, que implica la producción de moléculas de oxígeno aisladas. Los kits de ensayo *SureFire* están disponibles comercialmente para objetivos específicos e incluyen pares de anticuerpos validados (PerkinElmer). Este informe describe los procedimientos comunes aplicados para los ensayos de *SureFireAlphaScreen* y sus respectivos pasos semi-automatizados para la rutina de perfilamiento de un inhibidor de cinasa en ensayos basados en células.

Las líneas celulares Rat-1 que sobreexpresan establemente a las isoformas de la PI3K activada de clase I Rat-1 pBabePuro Myr-HA-HP110 delta (Rat-1_PI3Kdelta); Rat-1 pBabePuro Myr-HA-hp110alpha (Rat-1_PI3Kalpha) y Rat-1 pBabePuroMyr- HA-HP110 beta (Rat-1_PI3beta) se prepararon como se describe (Maira SM, Stauffer F, Brueggen J, Furet P, Schnell C, Fritsch C, Brachmann S, Chène P, de Pover A, Schoemaker K, Fabbro D, Gabriel D, Simonen M, Murphy L, Finan P, Sellers W, García-Echeverría C (2008), *Mol CancerTher.* 7:1851-63 and Maira SM, Pecchi S, Brueggen J, Huh K, Schnell C, Fritsch C, Nagel T, Wiesmann M, Brachmann S, Dorsch M, Chène P, Schoemaker K, De Pover A, Menezes D, Fabbro D, Sellers W, García-Echeverría C, Voliva CF (2011), *Mol. CancerTher.*, accepted). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de crecimiento completo (DMEM alto contenido de glucosa, 10% (v/v) de suero fetal bovino, 1% (v/v) MEM NEAA, HEPES10 mM L-glutamina, 2 mM, puromicina (10 mg/ml para Rata-1_PI3Kdelta y Rata-1_PI3Kalpha, 4 ug/ml de Rata-1_PI3beta), 1% (v/v) de penicilina/estreptomina) a un 90% de

confluencia a 37 ° C/CO₂ al 5%/ 90% de humedad en un incubador de CO₂ humidificado y se dividieron dos veces a la semana.

5 Los siguientes materiales fueron utilizados para la detección de p-AKT (S473) en lisados de células Rat-1: medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), niveles altos de glucosa (Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, Cat. N ° 41965.), Suero fetal bovino inactivado por calor, MEM aminoácidos no esenciales (NEAA; Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, art 11140) HEPES (Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, Lote No. 16140 HI FBS.), (Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, Cat. No. 15630), penicilina/estreptomicina (Pen/Strep, 100x, Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, art 15140-122), L-glutamina (Gibco Invitrogen, Basilea, Suiza, art 25030), puromicina (Sigma Aldrich, Buchs, Suiza, cat. No. p9620), DMSO (Merck, Dietikon, Suiza, cat. No. 8.02912.2500), H₂O, H₂O Milli-Q- a menos de que se indique lo contrario (Millipore QGARDOR1, Millipore, Zug, Suiza), albúmina de suero bovino (BSA; Sigma Aldrich, Buchs, Suiza No. de Cat. A8412), Kit de ensayo SureFire p-Akt (Ser473) (Perkin Elmer, Schwerzenbach, Suiza, Cat. No. TGRAS50K).

10 El ensayo p-Akt (S473) de SureFire mide la fosforilación endógena celular de Akt en lisados celulares de Ser473. El uso de células Rat-1 que expresan de forma estable las versiones myr-HA-etiquetadas de las isoformas de las subunidades catalíticas humanas p110PI3Kdelta, PI3Kalfa, o PI3Kbeta, el ensayo fue desarrollado como un protocolo de dos placas en un formato de 384 pozos.

15 Para ensayar los compuestos, se sembraron las células a una densidad de 4,000 células (Rata-1_PI3Kdelta), 7500 (Rata-1_PI3Kalpha), o 6200 (Rata-1_PI3Kbeta) en 20 µl de medio de crecimiento completo en placas de cultivo de 384 pozos tratadas y fueron cultivadas a 37 °C/CO₂ al 5%/ 90% de humedad durante 24 h. Poco antes de la transferencia del compuesto, se retiró el medio completo, se añadieron 30 µl de amortiguador de ensayo (DMEM alto en glucosa, 1x MEM NEAA, HEPES 10 mM, L-glutamina 2 mM, 0.1% (w/v) de BSA) y fueron transferidos 10 µl de las prediluciones de los compuestos a las células. Para la prueba realizada después de febrero de 2010, se sustituyó el amortiguador de ensayo por un medio de crecimiento completo, que reveló resultados similares (datos no mostrados). Después del tratamiento con el compuesto durante 1 h, las células se lisaron mediante la adición de 20 µl de amortiguador de lisis suplementado con 0.24% (w/v) de BSA. La detección de p-AKT (Ser473) se realizó por medio del Kit de ensayo SureFire p-Akt1/2(Ser473) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando 5 µl de lisado de células en un volumen de detección total de 12 µl.

20 Los valores de IC₅₀ de la inhibición porcentual de cada compuesto a 8 concentraciones (por lo general 10, 3.0, 1.0, 0.3, 0.1, 0.030, 0.010 y 0.003 M) n = 2 se derivaron mediante una curva sigmoide de ajuste de dosis-respuesta a una gráfica de la lectura del ensayo sobre la concentración del inhibidor como se describe. Todos los ajustes se realizaron con el programa XLfit4 (ID Business Solutions, Guildford, Reino Unido).

Ensayo celular para mTOR

35 Se desarrolló un ensayo basado en células (en un formato de 384 pozos) para la determinación de los efectos del compuesto sobre la actividad de mTOR celular en MEF (fibroblastos de embrión de ratón) las células derivadas de ratones que carecen de TSC1 (Complejo 1 de Tuberculosis) un potente supresor de la actividad de mTOR. Debido a la falta de TSC1, el mTOR se activa constitutivamente lo que resulta en una fosforilación permanente del Thr 389 de la cinasa S6 1 (S6K1), que es uno de los objetivos de corriente abajo de mTOR.

40 El uso de un kit SureFire permite determinar la fosforilación del Thr389 en la S6K1 se desarrolló un ensayo, validado e implementado en el formato Alpha-Screen que permite la determinación cuantitativa de fosfo-T389 de S6K1 en los lisados celulares. El tratamiento de las células MEF TSC1-/- con inhibidores específicos de mTOR (o vía mTOR-) reducen los niveles dosis-dependiente de fosfo-T389 de S6K1 que permita calcular los valores de IC₅₀. Estos estaban de acuerdo con los valores obtenidos con el ensayo bioquímico de unión a ATP de mTOR que permite una comparación cuantitativa de la potencia de los inhibidores de mTOR.

45 Las células TSC1-/- MEFs (Kwiatkowski, DJ, Zhang, H., Bandura, JL, Heiberger, KM, Glogauer, M., el-Hachemita, N., y Onda, H. (2002) Hum Mol Genet - TSC1-/-... 11, 525-534) se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa suplementado con FBS al 10% (Invitrogen), glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina al 1% (p/v) a 37 ° C, y CO₂ al 5%.

50 El kit SureFire para la determinación de la fosforilación de la cinasa P70S6 se adquirió a Perkin Elmer (p70S6K p-T389, # TGR70S50K) y el ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del proveedor y de acuerdo con el método genérico para los ensayos SureFire. Poco, se transfirieron 5 µl de lisado celular por pozo a las placas blancas de 384 pozos (para la lectura luminiscente) y se mezclaron con 7 µl de A y 5 µl de B (volumen final: 12 µl.) Después de 3 h de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente, la luminiscencia se medirá con un lector Envision (Perkin Elmer). Las células no tratadas se utilizaron como control (control alto) y las células tratadas con BEZ2353 mM se utilizaron como bajo control. La ventana de análisis entre las señales obtenidas por los controles alto y bajo se define como el 100% y los efectos del compuesto se expresaron como un porcentaje de inhibición. Los valores de IC₅₀ se calculan a partir de las curvas de respuesta a la dosis mediante extrapolación gráfica.

55 Los resultados obtenidos con los ensayos anteriormente descritos se proporcionan en las siguientes tablas.

ES 2 641 820 T3

Ensayo Bioquímico PI3Kalfa

| Ejemplo No. | PI3Ka/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.006 |
| 2 | 0.078 |
| 3 | 0.005 |
| 4 | 0.047 |
| 5 | 0.023 |
| 6 | 0.071 |
| 7 | 0.061 |
| 8 | 0.057 |
| 9 | 0.010 |
| 10 | 0.009 |
| 11 | 0.017 |
| 12 | 0.008 |
| 13 | 0.006 |
| 14 | 0.007 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 0.094 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 0.091 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.016 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 0.327 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 0.015 |

Ensayo Bioquímico PI3Kbeta

| Ejemplo No. | PI3Kb/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|-------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.009 |
| 2 | 0.096 |
| 3 | 0.007 |
| 4 | 0.159 |
| 5 | 0.031 |
| 6 | 0.460 |
| 7 | 0.110 |
| 8 | 0.067 |
| 9 | 0.015 |
| 10 | 0.005 |
| 11 | 0.010 |

ES 2 641 820 T3

| Ejemplo No. | PI3Kb/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 12 | 0.007 |
| 13 | 0.011 |
| 14 | 0.006 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 0.237 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 0.236 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.015 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 1.067 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 0.027 |

Ensayo Bioquímico PI3Kdelta

| Ejemplo No. | PI3Kd/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.003 |
| 2 | 0.027 |
| 3 | 0.004 |
| 4 | 0.066 |
| 5 | 0.147 |
| 6 | 0.079 |
| 7 | 0.041 |
| 8 | 0.026 |
| 9 | 0.010 |
| 10 | 0.031 |
| 11 | 0.014 |
| 12 | 0.004 |
| 13 | 0.003 |
| 14 | 0.016 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 0.848 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 1.978 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.024 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 1.219 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 0.110 |

ES 2 641 820 T3

Ensayo Bioquímico PI3Kgamma

| Ejemplo No. | PI3Kg/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.092 |
| 2 | 5.8 |
| 3 | 0.110 |
| 4 | 4.5 |
| 5 | 3.5 |
| 6 | 7 |
| 7 | 3 |
| 8 | 0.580 |
| 9 | 0.230 |
| 10 | 0.343 |
| 11 | 0.102 |
| 12 | 0.135 |
| 13 | 0.100 |
| 14 | 0.027 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 3.36 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 7.35 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.315 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 4.46 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 0.170 |

Ensayo de unión mTor

| Ejemplo No. | mTor/IC50 [$\mu\text{mol l}^{-1}$] |
|-------------|--------------------------------------|
| 1 | 0.251 |
| 2 | 2.8 |
| 3 | 0.850 |
| 4 | >9.7 |
| 5 | 2.25 |
| 6 | 4.7 |
| 7 | 2.7 |
| 8 | 0.960 |
| 9 | |
| 10 | 1.01 |
| 11 | 0.870 |

ES 2 641 820 T3

| Ejemplo No. | mTor/IC50 [umol l-1] |
|---------------------------|----------------------|
| 12 | 0.750 |
| 13 | 0.230 |
| 14 | 0.490 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 5.06 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 3.3 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 2.35 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | >9.55 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | >10 |

Ensayo celular PI3Kalfa

| Ejemplo No. | Rat1-PI3Ka/IC50 [umol l-1] |
|---------------------------|----------------------------|
| 1 | 0.031 |
| 2 | 1.07 |
| 3 | 0.074 |
| 4 | 0.597 |
| 5 | 0.434 |
| 6 | 0.930 |
| 7 | 0.452 |
| 8 | 0.173 |
| 9 | 0.029 |
| 10 | 0.085 |
| 11 | 0.032 |
| 12 | 0.063 |
| 13 | 0.126 |
| 14 | 0.046 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 0.369 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 0.606 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.127 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 1.730 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | >10 |

Ensayo celular PI3Kbeta

| Ejemplo No. | Rat1-PI3Kb/IC50 [umol l-1] |
|-------------|----------------------------|
| 1 | 0.020 |

ES 2 641 820 T3

| Ejemplo No. | Rat1-PI3Kb/IC50 [umol l-1] |
|---------------------------|----------------------------|
| 2 | 0.751 |
| 3 | 0.033 |
| 4 | 0.757 |
| 5 | 0.201 |
| 6 | 0.420 |
| 7 | 0.430 |
| 8 | 0.026 |
| 9 | 0.254 |
| 10 | 0.023 |
| 11 | 0.026 |
| 12 | 0.064 |
| 13 | <0.003 |
| 14 | 0.007 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 1.54 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 1.58 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.156 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 5.31 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | >10 |

Ensayo celular PI3Kdelta

| Ejemplo No. | Rat1-PI3Kd/IC50 [umol l-1] |
|-------------|----------------------------|
| 1 | 0.0113 |
| 2 | 0.105 |
| 3 | 0.006 |
| 4 | 0.298 |
| 5 | 0.119 |
| 6 | 0.144 |
| 7 | 0.123 |
| 8 | 0.028 |
| 9 | 0.011 |
| 10 | 0.022 |
| 11 | 0.020 |
| 12 | 0.004 |
| 13 | <0.003 |

| Ejemplo No. | Rat1-PI3Kd/IC50 [umol l-1] |
|---------------------------|----------------------------|
| 14 | 0.004 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 1.04 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 1.47 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 0.139 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 6.54 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 0.105 |

Ensayo celular mTOR

| Ejemplo No. | mTOR S6K(T389) TSC1ko/IC50 [umol l-1] |
|---------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.243 |
| 2 | >2.27 |
| 3 | 0.159 |
| 4 | >2.27 |
| 5 | 0.371 |
| 6 | >2.27 |
| 7 | >2.27 |
| 8 | >4.55 |
| 9 | |
| 10 | 0.221 |
| 11 | 0.747 |
| 12 | 0.274 |
| 13 | 1.07 |
| 14 | 0.724 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 2.12 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | >2.27 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 1.03 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | >2.27 |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | >2.27 |

Fotoestabilidad

- 5 Las muestras analizadas para evaluar su estabilidad a la luz fueron tratadas en una cámara de estabilidad a la luz (Atlas CPS +, Número de serie 0704013). Se prepararon soluciones de 1.0mg/ml en etanol para cada molécula y se dispensaron alícuotas de 0.5 ml en micro tubos adecuados. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y se compararon con una referencia envuelta en papel de aluminio durante la exposición a la luz. Las soluciones fueron expuestas a 19620kJ/m² sobre las 13h. Las muestras se mantuvieron a 15 ° C durante el experimento. Después del
- 10 tratamiento en la cámara de la luz, las soluciones se analizaron por UPLC (UPLC 1, parte experimental) a 254 nm. Las áreas de los picos se integraron automáticamente, y el porcentaje de degradación se calculó como la diferencia

entre el correspondiente porcentaje de área del pico de la muestra de referencia y el porcentaje promedio del área del pico de las muestras expuestas (duplicado).

Los datos obtenidos con este método se muestran en la tabla siguiente:

| Ejemplo No. | % de degradación en el ensayo de fotoestabilidad (promedio) |
|---------------------------|---|
| 1 | 8% |
| 2 | 3% |
| 3 | 3% |
| 5 | 17% |
| 6 | 0% |
| 10 | 7% |
| 12 | 12% |
| 13 | 4% |
| 14 | 8% |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 82% |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 81% |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 40% |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 54% |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 31% |

5 Inhibición anti-proliferativa sobre la proliferación de líneas celulares

Células y cultivos celulares utilizados para la caracterización de compuestos

Las SCL-1 y SCC12B2 son líneas de células escamosas cutáneas humanas del carcinoma de células (SCC) derivadas de las de origen natural, y pobremente diferenciadas SCC. La línea celular SCL-1 se estableció originalmente en el laboratorio de N. Fusenig en la Investigación en el Centro del Cáncer en Heidelberg, y sus características de crecimiento *in vitro* en comparación con los queratinocitos normales fueron descritas anteriormente (Neely et al 1991). La línea celular SCC12B2 se estableció como se ha descrito previamente (Rheinwald y Beckett, 1981) a partir de la piel de la cara de un paciente con trasplante de sexo masculino que recibió la terapia inmunosupresora de 7 años. La línea celular humano SCC Detroit562 se obtuvo de American Tissue Culture Collection (ATCC). Detroit562 se conoce como Head&Neck carcinomas de células escamosas (CECC) y se deriva de un tumor SCC. La línea celular Detroit562 desencadena la activación de la mutación H1047R del gen PIK3CA. Esta mutación es conocida como una de las mutaciones "punto caliente" de p110 α - la cadena que representa a la isoforma de esta cinasa constitutivamente activa y la estimulación de la vía de Akt/mTOR independiente de la activación del receptor del factor de crecimiento. Todas las líneas celulares SCC se mantuvieron y se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, número de catálogo: # 10938), que se complementó adicionalmente con 5% de FCS (Gibco, # 16000-044), 100 μ M de sodio-piruvato (Gibco; # 11360-039), 10 mM de HEPES (Gibco, # 91002-066), 50U/ml penicilina y estreptomycin mezcla de 50 μ g/ml (Gibco, # 15070-063), y 2 mM L-glutamina (Gibco, # 25030-024). Todas las concentraciones se dan como concentraciones definitivas. Las células se propagaron en frascos Corning Costar con tapas de ventilación, utilizando cualquiera de los dos tamaños de frasco con áreas de crecimiento de 75cm² (Corning, # 430641), o 150cm² (Corning, # 430825). Los cultivos celulares se mantuvieron rutinariamente a 37 ° C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂ y 80% de humedad relativa (tipo Heraeus).

Medida de la proliferación celular

Las células de SCC o líneas de queratinocitos (Detroit562, SCC12B2, SCL1, HaCaT) se utilizaron para los ensayos de proliferación cuando habían alcanzado alrededor del 80% al 90% de confluencia. Las células fueron cosechadas después de un desalojamiento de los frascos de cultivo mediado con tripsina, se lavaron en un medio de cultivo que contiene 10% de FCS, se contaron en un hemocitómetro y en medio de cultivo completo diluido con 5% de FCS para obtener una densidad celular de 5x10⁴ células/ml. Fueron transferidos 100 μ l de esta suspensión de células (por

ejemplo, 5000 células) en cada pozo de una placa blanca de cultivo de tejidos de 96 pozos (artículo Corning-Costar # 3917). Después las células se dejaron sedimentar por su inclusión en el incubador de CO₂ durante 45 a 60 minutos. Posteriormente, se añadió un volumen de 100µl de medio de cultivo que contiene el doble de la concentración final deseada del compuesto de ensayo a cada pozo por pozos cuadruplicados. Un cuadruplicado recibió 100µl de medio de cultivo sin el artículo de prueba como de control (se indica en las figuras de datos con la abreviatura no cpd en el eje x). Los cultivos celulares se incubaron a continuación en presencia o ausencia de los compuestos de ensayo para un total de 26 a 28 horas. La proliferación celular se determinó sobre la base de la incorporación de bromodesoxiuridin (BrdU) en el ADN celular utilizando el quimioluminiscente de proliferación de células BrdU ELISA (artículo de Roche # 11 669 915 001). En pocas palabras, el reactivo de BrdU se diluyó 1:100 con medio de cultivo completo para obtener una concentración de 100µM BrdU. A partir de esta solución, se añadieron 20µl a cada pozo y el cultivo celular se incubó adicionalmente durante 16 a 18 horas a 37 ° C en 5% de CO₂. El ensayo de proliferación se detuvo después de 44 a 46 horas con la eliminación completa del medio de cultivo y la adición de 200µl de solución de fijación (proporcionado con el kit de ELISA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las siguientes incubaciones, lavados y procedimientos de desarrollo de los ensayos se llevaron a cabo exactamente como se describe en el manual de ensayo de ELISA proporcionado por el fabricante (Roche). La incorporación de BrdU en el ADN se detectó mediante anticuerpos BrdU-específicos y fueron cuantificados sobre la base de una luciferasa de generación de señal mediada por un anticuerpo acoplado. La emisión de luminiscencia se midió en un contador de luminiscencia luz 1420 Victor, (Perkin Elmer) y se expresó como unidades relativas de luminiscencia (por ejemplo, puntos de datos dados como RLU/s) por segundo. Los puntos de datos de cada pozo se transfirieron a las hojas de cálculo de Excel de Windows ® para el cálculo de los valores medios y la desviación estándar. Estos valores fueron graficados utilizando la función de curva sigmoidal de ajuste disponible en el software origin 7.5 ®.

Potencia anti-proliferativa de los compuestos medidos en las líneas celulares SCC Los datos obtenidos usando estas líneas celulares de queratinocitos y SCC se muestran en la siguiente tabla. Todos los valores que indican la potencia anti-proliferativa representan las concentraciones nanomolares de IC₅₀ obtenidas en dos ensayos independientes utilizando cualquiera de las líneas de células SCC SCL-1, SCC12B2, Detroit562 o la línea celular de queratinocitosHaCaT:

| Ejemplo No. | SCC12B2 | | SCL-1 | | Detroit562 | | HaCaT | |
|---------------------------|---------|------|-------|------|------------|------|-------|------|
| | # 1 | # 2 | # 1 | # 2 | # 1 | # 2 | # 1 | # 2 |
| Ejemplo 1 | 1289 | 703 | 351 | 268 | 598 | 440 | 282 | 298 |
| WO2007/084786 Ejemplo 17 | 5823 | 4938 | 4891 | 3302 | 3084 | 4408 | 2796 | 3961 |
| WO2007/084786 Ejemplo 18 | 5737 | 5250 | 4267 | 3267 | 2813 | 4550 | 1655 | 3078 |
| WO2007/084786 Ejemplo 85 | 1645 | 1144 | 1025 | 636 | 1905 | 1448 | 1057 | 1017 |
| WO2007/084786 Ejemplo 324 | 6296 | | 6040 | | 3304 | | 3700 | |
| WO2007/084786 Ejemplo 343 | 4861 | 2471 | 2624 | 1683 | 2393 | 1371 | 1616 | 1490 |

Todos los valores están en concentraciones nanomolares de IC₅₀

Penetración de la piel

Las propiedades de penetración/permeación de la piel de un compuesto representativo de la presente invención fueron evaluadas de la siguiente manera:

Prueba *in vitro* para determinar la penetración en la piel y las propiedades de permeación

El compuesto se aplica en forma de soluciones al 0.5% en propilenglicol mezclado con etanol o alcohol oleico a piel de cerdo montada en celdas de difusión estática de tipo Franz. Al final de un tiempo de exposición de 48 horas, se midieron las concentraciones de fármaco en la piel (después de la eliminación del estrato córneo) y en el receptor. La solución del receptor es una mezcla de dos partes en volumen de amortiguador fosfato salino (PBS) y una parte en volumen de suero fetal de ternera (FCS).

Penetración de la piel y permeación in vitro

ES 2 641 820 T3

| Ejemplo | Fuente de la piel (a) | Formulación | Concentración [%] de compuesto | Concentración de la piel [mg/g] | Tasa de permeación [ng/cm ² /h] |
|---------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|--|
| 1 | Cerdo | PG + etanol (7 3) (b) | 0.5 | 10.8 ± 1.7 | 1.0 ± 0.3 |
| 1 | Cerdo | PG/OA (9 1) (c) | 0.5 | 107.6 ± 31.4 | 301.1 ± 129.5 |

Las concentraciones de piel se dan como media ± desviación estándar de las determinaciones por cuadruplicado.

(A): la piel se obtiene a partir de cerdos de granja de 4 meses de edad (Landrace X DeutschesEdelschwein)

(B): 7 partes en volumen de propilenoglicol (PG) se mezclan con de 3 partes en volumen de etanol

5 (C): 9 partes en volumen de PG mezclaron con 1 parte en volumen de alcohol oleico (OA)

El compuesto del ejemplo 1 penetra bien en la piel de cerdo *in vitro*, mientras que la tasa de permeación a través de piel de cerdo es baja, lo que indica una exposición sistémica baja. La piel de cerdo es similar a la piel humana con respecto a la función de barrera y a la arquitectura.

Prueba *in vivo* para determinar la penetración en la dermis de los cerdos tratados por vía tópica

10 Las áreas pequeñas de la piel (4cm²) en la parte posterior dorso lateral de cerdos domésticos jóvenes fueron tratadas tópicamente con soluciones o suspensiones al 0.5% en diferentes intervalos de tiempo (2 y 24 h) antes de la determinación del nivel de los fármacos. En este experimento, 4 cerdos fueron tratados, y el compuesto administrado en la formulación respectiva en 4 sitios diferentes. Los colgajos de piel con los sitios tratados en el centro fueron disecados y eliminados. Los colgajos de piel se extendieron, en bloques de metal con calefacción en los sitios de ensayo durante 1 minuto para inducir la separación de la epidermis de la dermis. Después del retiro de las láminas epidérmicas aflojadas, se prepararon cortes dérmicos de 1 mm de espesor a partir de la piel tratada, la piel de-epidermizada con un dermatoma. A partir de estos cortes se recogieron y analizaron las muestras de perforación de 6 mm (6 mm de diámetro) para la concentración de compuesto de ensayo mediante LC/MS. El procedimiento descrito se realiza con cuidado de evitar la contaminación de las muestras dérmicas con compuesto unido superficialmente a la epidermis.

La siguiente tabla proporciona las concentraciones dérmicas de compuesto del ejemplo 1 en la dermis de cerdo cuando se aplica epicutáneamente en las formulaciones identificadas. La tabla de datos proporciona la media ± el error estándar de la media de 8 determinaciones (por ejemplo, ocho muestras de piel analizadas con respecto a cada punto de tiempo).

25 PK de la piel en cerdos *in vivo*

| Ejemplo | Formulación composición de compuesto añadido al 0.5% | Concentración dermis [mg/g] medida después de 2h | Concentración dermis [mg/g] medida después de 24 horas |
|---------|--|--|--|
| 1 | 1% de Tween ® 80, 98% de agua, 1% de HPMC | 0.95 ± 0.42 | 1.29 ± 0.54 |
| 1 | 10% OA, 89% de agua, 1% Sepineo | 2.58 ± 0.48 | 0.37 ± 0.13 |
| 1 | 10% de EtOH, 89% de agua, 1% de HPMC | 1.57 ± 0.52 | 0.66 ± 0.38 |
| 1 | 10% de EtOH, 10% de PG, 79% de agua, 1% de HPMC | 0.68 ± 0.2 | 0.52 ± 0.24 |

Se da la Media ± el error estándar medio de ocho determinaciones

Tween ® 80: monooleato de polioxietilensorbitán

OA: Alcohol oleico

PG: propilenglicol

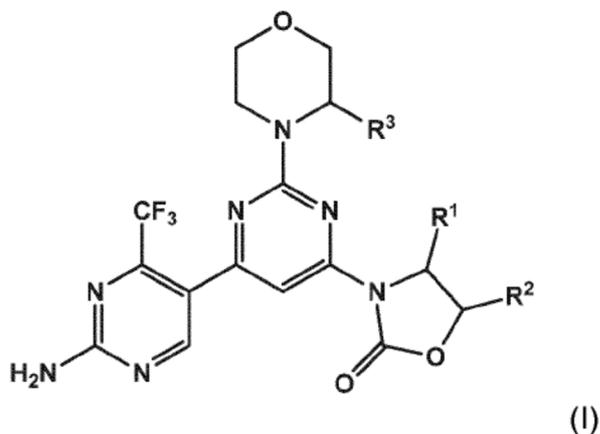
EtOH: etanol

HPMC: hidroxipropilmetilcelulosa

El compuesto del ejemplo 1 penetra bien en la piel de cerdo al llegar a la dermis *in vivo* después de una sola aplicación.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula (I) y/o una sal farmacéuticamente aceptable y/o solvato del mismo,



en donde,

5 R¹ es metilo, etilo o hidroximetilo;

R² es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, C₁- C₅- alcoxilo, hidroxi- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para,

o

10 piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, C₁- C₅- alcoxilo, hidroxi- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para,

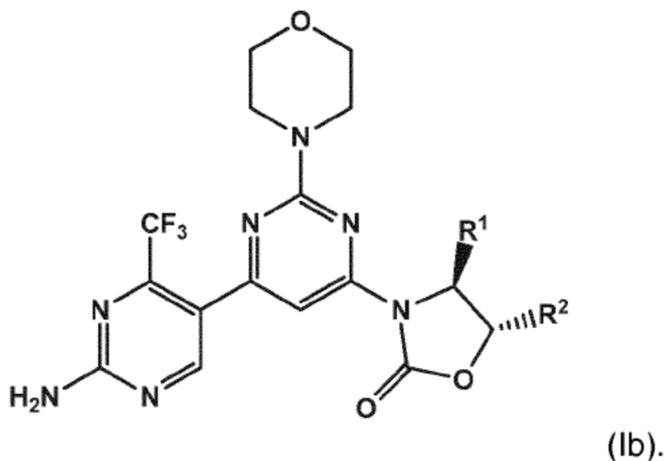
o

15 un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F;

y

R³ es H o metilo.

2.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, de la fórmula (Ib)



20 3.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde

R² es fenilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes

independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, C₁- C₅- alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

4.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde

5 R² es piridilo, que se sustituye o no se sustituye en las posiciones meta y/o para con 1 o 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D, F o metoxilo para la posición meta y a partir de D, F, C₁- C₅- alcoxilo, hidroxilo- C₂- C₄- alcoxilo o C₁- C₂- alcoxi- C₂- C₄- alcoxilo para la posición para.

5.- Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde

R² es un heteroarilo monocíclico de 5 miembros, que contiene 2 a 3 heteroátomos seleccionados a partir de N, O, o S, que se sustituye o no se sustituye con 1 a 2 sustituyentes independientemente seleccionados a partir de D o F.

10 6.- Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde

R¹ es metilo.

7.- Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde

R¹ es etilo.

8.- Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde

15 R¹ es hidroximetilo.

9.- Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado a partir de

(4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-metil-5-tiazol-2-il-oxazolidin-2-ona,

(4S*,5S*)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-etil-5-(4-metoxifenil)oxazolidin-2-ona,

20 (4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-(4-metoxifenil)oxazolidin-2-ona,

(4S*,5R*)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-etil-5-feniloxazolidin-2-ona,

(4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-metil-5-feniloxazolidin-2-ona,

(4R*,5R*)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-etil-5-(3-metoxifenil)oxazolidin-2-ona,

25 (4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-etil-5-(tiazol-2-il)oxazolidin-2-ona,

3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-etil-5-piridin-3-il-oxazolidin-2-ona,

3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-metil-5-piridin-3-il-oxazolidin-2-ona,

(4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-hidroximetil-5-fenil-oxazolidin-2-ona,

(4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-metil-5-tiazol-2-il-oxazolidin-2-ona,

30 (4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-(4-(2-metoxietoxi)fenil)oxazolidin-2-ona,

(4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-5-(4-(2-hidroxi)fenil)-4-(hidroximetil)oxazolidin-2-ona o

35 (4S,5S)-3-(2'-amino-2-morfolin-o-4'-(trifluorometil)-[4,5'-bipirimidin]-6-il)-4-(hidroximetil)-5-(4-(3-hidroxipropoxi)fenil)oxazolidin-2-ona.

10. Un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que es

(4S,5R)-3-(2'-amino-2-morfolin--4-il-4'-triflorfometil-[4,5']bipirimidinil-6-il)-4-metil-5-tiazol-2-il-oxazolidin-2-ona

40 11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

12. Una combinación que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y uno o más co-agentes

terapéuticamente activos.

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar como un medicamento.

5 14. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de cánceres de piel no melanoma o etapas pre-malignas de cáncer de piel no melanoma.

15. Un compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer de piel no melanoma es el carcinoma de células escamosas y la etapa pre-maligna del cáncer de piel no melanoma es la queratosis actínica.