

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 497**

51 Int. Cl.:

**C07D 498/04** (2006.01)

**A61K 31/553** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016 PCT/EP2016/065455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17001645**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16733600 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2019 EP 3317284**

54 Título: **Compuestos de benzoxazepina oxazolidinona y procedimientos de uso**

30 Prioridad:

**02.07.2015 US 201562188029 P**

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

**03.06.2020**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BRAUN, MARIE-GABRIELLE;  
ELLIOTT, RICHARD;  
HANAN, EMILY;  
HEALD, ROBERT ANDREW;  
MACLEOD, CALUM y  
STABEN, STEVEN T.**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 764 497 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de benzoxazepina oxazolidinona y procedimientos de uso

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud no provisional presentada conforme a 37 CFR § 1.53 (b) reivindica el beneficio conforme a 35 USC § 119 (e) sobre la solicitud provisional de EE. UU. con n.º de serie 62/188.029 presentada el 2 de julio de 2015, que se incorpora por referencia en su totalidad.

10

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere en general a compuestos de benzoxazepina oxazolidinona con actividad contra trastornos hiperproliferativos tales como el cáncer. La invención también se refiere a procedimientos de uso de los compuestos para el diagnóstico o tratamiento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* de células de mamífero, o procesos patológicos asociados.

15

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 La regulación por incremento de la vía de señalización de fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K)/Akt es un rasgo característico común en la mayoría de los cánceres (Yuan y Cantley (2008) *Oncogene* 27:5497-510). Se han detectado desviaciones genéticas en esta vía en muchos cánceres humanos (Osaka *et al.* (2004) *Apoptosis* 9:667-76) y actúan principalmente para estimular la proliferación celular, la migración y la supervivencia. La activación de esta vía se produce después de activar mutaciones o amplificaciones puntuales del gen *PIK3CA* que codifica las isoformas de PI3K p110 $\alpha$  (alfa) (Hennessy *et al.* (2005) *Nat. Rev. Drug Discov.* 4:988-1004). Las mutaciones genéticas de delección o pérdida de función dentro del supresor tumoral PTEN, una fosfatasa con función opuesta a PI3K, también incrementan la señalización de la vía de PI3K (Zhang y Yu (2010) *Clin. Cancer Res.* 16:4325-30). Estas aberraciones dan lugar a una señalización incrementada corriente abajo a través de cinasas tales como Akt y mTOR y se ha propuesto una actividad incrementada de la vía de PI3K como un rasgo característico de la resistencia al tratamiento del cáncer (Opel *et al.* (2007) *Cancer Res.* 67:735-45; Razis *et al.* (2011) *Breast Cancer Res. Treat.* 128:447-56).

25

30

35

La fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) es un importante nodo de señalización para las señales clave de supervivencia y crecimiento de los linfomas y su actividad es opuesta a la de la fosfatasa PTEN. La vía de señalización de la cinasa dependiente de fosfoinosítido 3 (PI3K) es la vía más incorrectamente regulada en el cáncer de mama con expresión de receptores hormonales (CM RH+). La vía de PI3K también está regulada incorrectamente en formas agresivas de linfoma (Abubaker (2007) *Leukemia* 21:2368-2370). El 8 % de los cánceres de DLBCL (linfoma difuso de linfocitos B grandes) tienen mutaciones de aminoácido en PI3CA (subunidad catalítica de la fosfatidilinositol 3-cinasa alfa) y el 37 % da resultado negativo para PTEN en una prueba de inmunohistoquímica.

40

45

50

El fosfatidilinositol es uno de varios fosfolípidos que se encuentran en las membranas celulares y que participan en la transducción de señales intracelulares. La señalización celular a través de fosfoinosítidos fosforilados en 3' se ha implicado en una variedad de procesos celulares, por ejemplo, transformación maligna, señalización de factores de crecimiento, inflamación e inmunidad (Rameh *et al.* (1999) *J. Biol Chem.* 274:8347-8350). La enzima responsable de generar estos productos de señalización fosforilados, la fosfatidilinositol 3-cinasa (también conocida como PI3-cinasa o PI3K), se identificó originalmente como una enzima con actividad asociada a oncoproteínas víricas y tirosina-cinasas receptoras de factores de crecimiento que fosforilan el fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el hidroxilo 3' del anillo de inositol (Panayotou *et al.* (1992) *Trends Cell Biol* 2:358-60). Las fosfoinosítido 3-cinasas (PI3K) son lípido-cinasas que fosforilan lípidos en el residuo 3-hidroxilo de un anillo de inositol (Whitman *et al.* (1988) *Nature*, 332:664). Los fosfolípidos trifosforilados (PIP3) generados por las PI3-cinasas actúan como segundos mensajeros reclutando cinasas con dominios de unión a lípidos (incluidas las regiones de homología con pleckstrina (PH)), tales como Akt y PDK1, cinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (Vivanco *et al.* (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:489; Phillips *et al.* (1998) *Cancer* 83:41).

55

60

65

La familia de las PI3-cinasas comprende al menos 15 enzimas diferentes subclasificadas según su homología estructural y se dividen en 3 clases en base a la homología de secuencia y al producto formado por catálisis enzimática. Las PI3-cinasas de clase I se componen de 2 subunidades: una subunidad catalítica de 110 kDa y una subunidad reguladora de 85 kDa. Las subunidades reguladoras contienen dominios SH2 y se unen a residuos de tirosina fosforilados por receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina-cinasa o productos oncogénicos, induciendo de este modo la actividad PI3K de la subunidad catalítica p110 que fosforila su sustrato lipídico. Las PI3-cinasas de clase I están involucradas en importantes eventos de transducción de señales corriente abajo de las citocinas, integrinas, factores de crecimiento e inmunorreceptores, lo que sugiere que el control de esta vía puede dar lugar a importantes efectos terapéuticos tales como la modulación de la proliferación celular y la carcinogénesis. Las PI3K de clase I pueden fosforilar el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol-4-fosfato y el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) para producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP), fosfatidilinositol-3,4-bifosfato y fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, respectivamente. Las PI3K de clase II fosforilan el PI y el fosfatidilinositol-4-fosfato.

Las PI3K de clase III solo pueden fosforilar el PI. Una isoforma clave de PI3-cinasa en el cáncer es la PI3-cinasa de clase I p110 $\alpha$ , como se indica por mutaciones oncogénicas recurrentes en p110 $\alpha$  (Samuels *et al.* (2004) Science 304:554; documento US 5824492; documento US 5846824; documento US 6274327). Otras isoformas pueden ser importantes en el cáncer y también están implicadas en enfermedades cardiovasculares e inmunoinflamatorias (Workman P (2004) Biochem Soc Trans 32:393-396; Patel *et al.* (2004) Proc. Am. Assoc. of Cancer Res. (Resumen LB-247) 95.<sup>a</sup> Reunión Anual, 27-31 de marzo, Orlando, Florida, EE. UU.; Ahmadi K y Waterfield MD (2004) "Phosphoinositide 3-Kinase: Function and Mechanisms" Encyclopedia of Biological Chemistry (Lennarz W J, Lane M D eds.) Elsevier / Academic Press). Se han encontrado mutaciones oncogénicas de p110 $\alpha$  (alfa) con una frecuencia significativa en tumores sólidos de colon, mama, cerebro, hígado, ovario, gástricos, de pulmón y de cabeza y cuello. Aproximadamente el 35-40 % de los tumores de cáncer de mama con expresión de receptores hormonales (RH+) albergan una mutación en *PIK3CA*. Las alteraciones en PTEN se encuentran en glioblastomas, melanomas, cánceres de próstata, endometrio, ovario, mama, pulmón, cabeza y cuello, hepatocelulares y de tiroides.

La PI3-cinasa (PI3K) es un heterodímero que consiste en las subunidades p85 y p110 (Otsu *et al.* (1991) Cell 65:91-104; Hiles *et al.* (1992) Cell 70:419-29). Se han identificado cuatro PI3K de clase I distintas, denominadas PI3K  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\delta$  (delta) y  $\gamma$  (gamma), cada una de las cuales consiste en una subunidad catalítica de 110 kDa distinta y una subunidad reguladora. Tres de las subunidades catalíticas, es decir, p110 alfa, p110 beta y p110 delta, interactúan cada una con la misma subunidad reguladora, p85, mientras que p110 gamma interactúa con una subunidad reguladora distinta, p101. Los patrones de expresión de cada una de estas PI3K en células y tejidos humanos son distintos. En cada uno de los subtipos PI3K alfa, beta y delta, la subunidad p85 actúa localizando la PI3-cinasa en la membrana plasmática mediante la interacción de su dominio SH2 con residuos de tirosina fosforilados (presentes en un contexto de secuencia apropiado) en proteínas diana (Rameh *et al.* (1995) Cell, 83:821-30; Volinia *et al.* (1992) Oncogene, 7:789-93).

La vía de PI3-cinasa/Akt/PTEN es una diana atractiva para el desarrollo de fármacos contra el cáncer, ya que cabría esperar que dichos agentes inhiban la proliferación celular, repriman las señales de las células del estroma que permiten la supervivencia y quimiorresistencia de las células cancerosas, reviertan la represión de la apoptosis y venzan la resistencia intrínseca de las células cancerosas a los agentes citotóxicos. La PI3K se activa a través de la señalización de la tirosina-cinasa receptora, así como activando mutaciones en la subunidad catalítica p110 de PI3K, la pérdida del supresor tumoral PTEN o a través de mutaciones de activación poco frecuentes en AKT.

Taselisib (GDC-0032, Roche RG7604, n.º CAS 1282512-48-4, Genentech Inc.), nombrado como 2-(4-(2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)-1H-pirazol-1-il)-2-metilpropanamida, tiene una potente actividad PI3K (Ndubaku, C. O. *et al.* (2013) J. Med. Chem. 56:4597-4610; documento WO 2011/036280; documento US 8242104; documento US 8343955) y se está estudiando en pacientes con tumores sólidos localmente avanzados o metastásicos. Taselisib (GDC-0032) es un inhibidor con conservación de isoformas beta de la subunidad catalítica de PI3K que es 31 veces más selectivo para la subunidad alfa en comparación con beta. Taselisib muestra una mayor selectividad por las isoformas PI3K $\alpha$  mutantes que por las PI3K $\alpha$  naturales (Olivero AG *et al.*, AACR 2013. Resumen DDT02-01). Taselisib se está desarrollando actualmente como un tratamiento para pacientes con cáncer de mama metastásico (CMm) sin expresión de HER2 y con expresión de receptores estrogénicos (RE) y carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM). En la fase la del estudio con taselisib como agente único se observaron respuestas parciales (RP) en 6/34 pacientes reclutados. Las 6 respuestas se observaron en pacientes con tumores con mutación en *PIK3CA* (Juric D. *et al.* AACR 2013), lo que indica la necesidad de determinar el estado de mutación en *PIK3CA* de los pacientes tratados con taselisib.

Datos clínicos recientes con inhibidores de PI3K han implicado la actividad contra PI3K delta como una fuente de toxicidades gastrointestinales (Akinleye *et al.*, "Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics", Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:88-104; C. Saura *et al.* "Phase Ib Study of the PI3K Inhibitor Taselisib (GDC-0032) in Combination with Letrozole in Patients with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer", San Antonio Breast Cancer Symposium - 12 de diciembre de 2014, PD5-2; López *et al.* "Taselisib, a selective inhibitor of PIK3CA, is highly effective on PIK3CA-mutated and HER2/neu amplified uterine serous carcinoma *in vitro* and *in vivo*" (2014) Gynecologic Oncology).

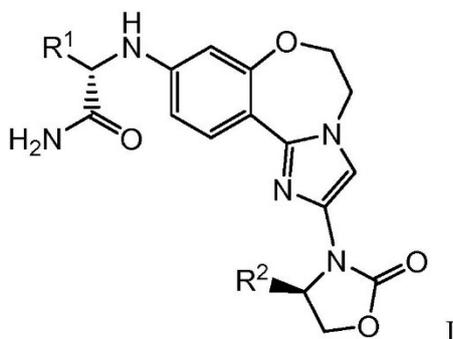
Idelalisib (GS-1101, CAL-101, ZYDELIG®, Gilead Sciences Inc., n.º CAS 870281-82-6, 5-fluoro-3-fenil-2-[(1S)-1-(7H-purin-6-ilamino)propil]-4(3H)-quinazolinona) es un inhibidor selectivo de PI3K $\delta$  (delta) y está aprobado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (LLC) (Somoza, J.R. *et al.* (2015) J. Biol. Chem. 290:8439-8446; documento US 6800620; documento US 6949535; documento US 8138195; documento US 8492389; documento US 8637533; documento US 8865730; documento US 8980901; documento RE44599; documento RE44638). La diarrea y la colitis se encuentran entre los acontecimientos adversos más comunes informados después del tratamiento con idelalisib (Brown *et al.* "Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110d, for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia" (2014) Blood 123(22):3390-3397; Información de prescripción de Zydelig® 2014; Ficha técnica de Zydelig® REMS). Las importantes toxicidades gastrointestinales observadas después del tratamiento con idelalisib son consecuentes con la hipótesis de que la inhibición de PI3K $\delta$  (delta) es una fuente de toxicidades gastrointestinales. Se observaron efectos secundarios graves adicionales en ensayos clínicos de idelalisib (Zydelig®) en combinación con otros tratamientos. Los acontecimientos adversos, incluyendo

las muertes, se han relacionado con infecciones tales como la neumonía. En marzo de 2016, el Comité para la Determinación del Riesgo en Farmacovigilancia (PRAC) de la EMA emitió una advertencia provisional y una recomendación de que los pacientes reciban un tratamiento combinado con antibióticos y se los controle de forma rutinaria para detectar infecciones cuando toman Zydelig (idelalisib). En marzo de 2016, la Food and Drug Administration de EE. UU. emitió una alerta de que “seis ensayos clínicos que exploran idelalisib (Zydelig®) en combinación con otros tratamientos se han paralizado debido a los informes de una mayor tasa de acontecimientos adversos, incluida la muerte”.

El documento US-B2-8.242.104 divulga inhibidores de PI3K basados en 5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepinas sustituidas. Existe la necesidad de moduladores de PI3K $\alpha$  adicionales que sean útiles para tratar cánceres, en particular un inhibidor de PI3K $\alpha$  que sea selectivo para tumores que expresan PI3K $\alpha$  mutante en relación con células que expresan PI3K $\alpha$  no mutante. Existe una necesidad especial de un agente de este tipo que inhiba selectivamente la isoforma PI3K $\alpha$  en relación con las isoformas PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$  y PI3K $\gamma$ , que cabe esperar que dé como resultado una ventana terapéutica potenciada.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se refiere en general a compuestos de benzoxazepina oxazolidinona con actividad selectiva en la modulación de formas mutantes de la isoforma PI3K $\alpha$  (alfa), y que tienen la estructura de la Fórmula I:



y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los diversos sustituyentes se definen en el presente documento.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un compuesto de benzoxazepina oxazolidinona de Fórmula I y un vehículo, fluidificante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un compuesto de Fórmula 1 para su uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer en un paciente que tiene cáncer que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de benzoxazepina oxazolidinona de Fórmula I.

Otro aspecto de la invención es un kit para el tratamiento terapéutico del cáncer de mama, que comprende:

- a) un compuesto de benzoxazepina oxazolidinona de Fórmula I; y
- b) instrucciones de uso en el tratamiento terapéutico del cáncer de mama

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra las estructuras de rayos X de cocrystalos de PI3K $\alpha$  con: A) taselisib (GDC-0032), B) Compuesto 529 del documento US 8242104, C) Compuesto **101** y D) Compuesto **103**.

La Figura 2 muestra las estructuras de rayos X de cocrystalos de PI3K $\alpha$  con: A) taselisib (GDC-0032), y B) Compuesto **101**.

La Figura 3A muestra datos de inmunoelctrotransferencia que representan los niveles de p110 $\alpha$  (p110a, p110 alfa) después de un tratamiento de 24 horas con el Compuesto **101**, el Compuesto **103** y el Compuesto 436 del documento US 8242104 en células HCC-1954 (PI3K $\alpha$  con mutación H1047R).

La Figura 3B muestra datos de inmunoelctrotransferencia que representan los niveles de p110 $\alpha$  (p110a, p110 alfa) después de un tratamiento de 24 horas con el Compuesto **101**, el Compuesto **103** y el Compuesto 436 del documento US 8242104 en células HDQ-P1 (PI3K $\alpha$  natural).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODOS DE REALIZACIÓN EJEMPLARES

Ahora se hará referencia en detalle a determinados modos de realización de la invención, en los que se ilustran ejemplos en las estructuras y fórmulas adjuntas. Aunque la invención se describirá junto con los modos de realización enumerados, se entenderá que no se pretende que limiten la invención a esos modos de realización. Por el contrario, se pretende que la invención cubra todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se pueden incluir dentro del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones. Un experto en la técnica reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita de ningún modo a los procedimientos y materiales descritos. En el caso de que uno o más de la literatura, patentes y materiales similares incorporados difiera de o contradiga la presente solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, términos definidos, uso de los términos, técnicas descritas, o similares, rige la presente solicitud. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. La nomenclatura usada en la presente solicitud se basa en la nomenclatura sistemática de la IUPAC, a menos que se indique de otro modo.

## DEFINICIONES

Quando se indica el número de sustituyentes, el término “uno o más” se refiere al intervalo desde un sustituyente hasta el número más alto posible de sustitución, es decir, desde el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes. El término “sustituyente” indica un átomo o un grupo de átomos que reemplazan un átomo de hidrógeno en una molécula original. El término “sustituido” indica que un grupo específico lleva uno o más sustituyentes. Cuando cualquier grupo puede llevar múltiples sustituyentes y se proporciona una variedad de posibles sustituyentes, los sustituyentes se seleccionan independientemente y no necesitan ser los mismos. El término “no sustituido” significa que el grupo especificado no lleva sustituyentes. El término “opcionalmente sustituido” significa que el grupo especificado no está sustituido o está sustituido por uno o más sustituyentes, elegidos independientemente del grupo de posibles sustituyentes. Cuando se indica el número de sustituyentes, el término “uno o más” significa desde un sustituyente hasta el número más alto posible de sustitución, es decir, desde el reemplazo de un hidrógeno hasta el reemplazo de todos los hidrógenos por sustituyentes.

El término “alquilo”, como se usa en el presente documento, se refiere a un radical hidrocarburo monovalente de cadena lineal o ramificada saturado de uno a doce átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>), en el que el radical alquilo puede estar opcionalmente sustituido independientemente por uno o más sustituyentes descritos a continuación. En otro modo de realización, un radical alquilo es de uno a ocho átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) o de uno a seis átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>). Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo (Me, -CH<sub>3</sub>), etilo (Et, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-propilo (n-Pr, n-propilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-propilo (i-Pr, i-propilo, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1-butilo (n-Bu, n-butilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-1-propilo (i-Bu, i-butilo, -CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-butilo (s-Bu, s-butilo, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-metil-2-propilo (t-Bu, t-butilo, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-pentilo (n-pentilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-1-butilo (-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1-hexilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2-hexilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-hexilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)), 2-metil-2-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4-metil-2-pentilo (-CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3-metil-3-pentilo (-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2-metil-3-pentilo (-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,3-dimetil-2-butilo (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,3-dimetil-2-butilo (-CH(CH<sub>3</sub>)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1-heptilo, 1-octilo y similares.

Los términos “carbociclo”, “carbocícilo”, “anillo carbocíclico” y “cicloalquilo” se refieren a un anillo saturado o parcialmente insaturado no aromático monovalente que tiene de 3 a 12 átomos de carbono (C<sub>3</sub>-C<sub>12</sub>) como un anillo monocíclico o de 7 a 12 átomos de carbono como un anillo bicíclico. Los carbociclos bicíclicos que tienen de 7 a 12 átomos se pueden disponer, por ejemplo, como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], y los carbociclos bicíclicos que tienen 9 o 10 átomos de anillo se pueden disponer como un sistema biciclo [5,6] o [6,6], o como sistemas con puente, tales como biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano y biciclo[3.2.2]nonano. También se incluyen restos carbocíclicos de espiro dentro del alcance de esta definición. Los ejemplos de restos carbocíclicos de espiro incluyen [2.2]pentanilo, [2.3]hexanilo y [2.4]heptanilo. Los ejemplos de carbociclos monocíclicos incluyen, pero no se limitan a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, 1-ciclopent-1-enilo, 1-ciclopent-2-enilo, 1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, 1-ciclohex-1-enilo, 1-ciclohex-2-enilo, 1-ciclohex-3-enilo, ciclohexadienilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclónonilo, ciclodecilo, cicloundecilo, ciclododecilo y similares. Los grupos carbocícilo están opcionalmente sustituidos independientemente por uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

“Ariilo” significa un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) derivado mediante la retirada de un átomo de hidrógeno de un único átomo de carbono de un sistema de anillos aromáticos original. Algunos grupos ariilo se representan en las estructuras ejemplares como “Ar”. Ariilo incluye radicales bicíclicos que comprenden un anillo aromático condensado a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo

carbocíclico aromático. Los grupos arilo típicos incluyen, pero no se limitan a, radicales derivados de benceno (fenilo), bencenos sustituidos, naftaleno, antraceno, bifenilo, indenilo, indanilo, 1,2-dihidronaftaleno, 1,2,3,4-tetrahidronaftilo y similares. Los grupos arilo están opcionalmente sustituidos independientemente por uno o más sustituyentes descritos en el presente documento.

Los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan de manera intercambiable en el presente documento y se refieren a un radical carbocíclico saturado o uno parcialmente insaturado (es decir, que tiene uno o más dobles y/o triples enlaces en el anillo) de 3 a aproximadamente 20 átomos de anillo, en el que al menos un átomo de anillo es un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, siendo C los átomos de anillo restantes, donde uno o más átomos de anillo están opcionalmente sustituidos independientemente por uno o más sustituyentes descritos a continuación. Un heterociclo puede ser un monociclo que tiene de 3 a 7 elementos de anillo (de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S) o un biciclo que tiene de 7 a 10 elementos de anillo (de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 6 heteroátomos seleccionados de N, O, P y S), por ejemplo, un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6]. Los heterociclos se describen en Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular los capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heterociclilo" también incluye radicales en los que los radicales heterocíclicos están condensados a un anillo saturado, parcialmente insaturado o un anillo aromático carbocíclico o heterocíclico. Los ejemplos de anillos heterocíclicos incluyen, pero no se limitan a, morfolin-4-ilo, piperidin-1-ilo, piperazinilo, piperazin-4-il-2-ona, piperazin-4-il-3-ona, pirrolidin-1-ilo, tiomorfolin-4-ilo, S-dioxotiomorfolin-4-ilo, azocan-1-ilo, azetidín-1-ilo, octahidropirido[1,2-a]pirazin-2-ilo, [1,4]diazepan-1-ilo, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, tetrahidrotiopiranilo, piperidino, morfolino, tiomorfolino, tiofanilo, piperazinilo, homopiperazinilo, azetidínilo, oxetanilo, tietanilo, homopiperidinilo, oxepanilo, tiepanilo, oxazepinilo, diazepinilo, tiazepinilo, 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, indolinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, pirazolinilo, dítianilo, ditiolanilo, dihidropiranilo, dihidrotienilo, dihidrofuranilo, pirazolidinimidazolinilo, imidazolidinilo, 3-azabicyclo[3.1.0]hexanilo, 3-azabicyclo[4.1.0]heptanilo, azabicyclo[2.2.2]hexanilo, 3H-indolilo, quinolizínilo y N-piridilureas. También se incluyen restos heterociclilos de espiro dentro del alcance de esta definición. Ejemplos de restos heterociclilo de espiro incluyen azaespiro[2.5]octanilo y azaespiro[2.4]heptanilo. Los ejemplos de un grupo heterocíclico en el que 2 átomos de anillo están sustituidos por restos oxo (=O) son pirimidinonilo y 1,1-dioxo-tiomorfolinilo.

El término "heteroarilo" se refiere a un radical aromático monovalente de anillos de 5, 6 o 7 elementos, e incluye sistemas de anillos condensados (de los que al menos uno es aromático) de 5-20 átomos, que contienen uno o más heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre. Los ejemplos de grupos heteroarilo son piridinilo (incluyendo, por ejemplo, 2-hidroxipiridinilo), imidazolilo, imidazopiridinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 4-hidroxipirimidinilo), pirazolilo, triazolilo, pirazinilo, tetrazolilo, furilo, tienilo, isoxazolilo, tiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, isotiazolilo, pirrolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, indolilo, bencimidazolilo, benzofuranilo, cinolinilo, indazolilo, indolizínilo, ftalazinilo, piridazinilo, triazinilo, isoindolilo, pteridinilo, purinilo, oxadiazolilo, triazolilo, tiadiazolilo, tiadiazolilo, furazanilo, benzofurazanilo, benzotiofenilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo y furopiridinilo.

Los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren al tratamiento terapéutico, en el que el objetivo es ralentizar (disminuir) un cambio fisiológico o trastorno indeseado, tal como el desarrollo o la propagación de la artritis o el cáncer. Para los propósitos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento), retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado de la enfermedad, y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos con la afección o trastorno.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto de la presente invención que (i) trata la enfermedad, afección o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular o (iii) previene o retarda la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección o trastorno particular descrito en el presente documento. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño tumoral; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral; y/o aliviar hasta cierto punto uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. En la medida en que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para el tratamiento del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo transcurrido hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR).

El término "cáncer" se refiere a o describe la afección fisiológica en los mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un "tumor" comprende una o más células cancerosas. Los ejemplos de

cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias malignas linfocíticas. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón, incluyendo carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago, incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o de útero, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, así como cáncer de cabeza y cuello.

Las “neoplasias malignas hemáticas” son los tipos de cáncer que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Como los tres están estrechamente conectados a través del sistema inmunitario, una enfermedad que afecte a uno de los tres a menudo también afectará a los demás: aunque el linfoma es una enfermedad de los ganglios linfáticos, a menudo se propaga a la médula ósea, afectando a la sangre. Las neoplasias malignas hemáticas son neoplasias malignas (“cáncer”) y, en general, se tratan por especialistas en hematología y/u oncología. En algunos centros, “hematología/oncología” es una única subespecialidad de medicina interna, mientras que en otros se consideran divisiones separadas (también existen oncólogos quirúrgicos y radiólogos). No todos los trastornos hemáticos son malignos (“cancerosos”); estas otras afecciones de la sangre también se pueden tratar por un hematólogo. Las neoplasias malignas hemáticas pueden derivar de cualquiera de los dos linajes celulares sanguíneos principales: líneas celulares mieloides y linfocíticas. La línea celular mielóide produce normalmente granulocitos, eritrocitos, trombocitos, macrófagos y mastocitos; la línea celular linfocítica produce linfocitos B, T, NK y plasmocitos. Los linfomas, las leucemias linfocíticas y el mieloma provienen de la línea linfocítica, mientras que la leucemia mielógena aguda y crónica, los síndromes mielodisplásicos y las enfermedades mieloproliferativas son de origen mielóide. Las leucemias incluyen leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia monocítica aguda (LMA) y linfoma linfocítico pequeño (LLP). Los linfomas incluyen linfomas hodgkinianos (los cuatro subtipos) y linfomas no hodgkinianos (LNH, todos los subtipos).

Un “agente quimioterápico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer, independientemente del mecanismo de acción. Las clases de agentes quimioterápicos incluyen, pero no se limitan a: agentes alquilantes, antimetabolitos, alcaloides de plantas venenosas fusiformes, antibióticos citotóxicos/antitumorales, inhibidores de topoisomerasa, anticuerpos, fotosensibilizadores e inhibidores de cinasa. Los agentes quimioterápicos incluyen compuestos usados en “tratamiento dirigido” y quimioterapia convencional. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen: ibrutinib (IMBRUVICA™, APCI-32765, Pharmacyclics Inc./Janssen Biotech Inc.; n.º CAS 936563-96-1, documento US 7514444), idelalisib (anteriormente CAL-101, GS 1101, GS-1101, Gilead Sciences Inc.; n.º CAS 1146702-54-6), erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (fluorouracilo, 5-fluorouracilo, n.º CAS 51-21-8), gemcitabina (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (n.º CAS 391210-10-9, Pfizer), cisplatino (Platinol®, (SP-4-2)-diaminodicloroplatino(II), cis-diamina dicloroplatino(II), n.º CAS 15663-27-1), carboplatino (n.º CAS 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomida (4-metil-5-oxo-2,3,4,6,8-pentazabicyclo[4.3.0]nona-2,7,9-trien-9-carboxamida, n.º CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifeno ((Z)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) y doxorubicina (ADRIAMYCIN®, n.º CAS 23214-92-8), Akti-1/2, HPPD y rapamicina.

Los agentes quimioterápicos incluyen inhibidores de dianas de receptores de linfocitos B tales como inhibidores de BTK, Bcl-2 y JAK.

Otros ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen: oxaliplatino (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (inhibidor de Mek, Exelixis, documento WO 2007/044515), ARRY-886 (inhibidor de Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (inhibidor de PI3K, Semaphore Pharmaceuticals), BEZ-235 (inhibidor de PI3K, Novartis), XL-147 (inhibidor de PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorina (ácido folínico), rapamicina, (sirólimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecán (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (sin Cremophor), formulaciones de nanopartículas genomanipuladas con albúmina de paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), clorambucilo, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirólimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamida (TELCYTA®, Telik), tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN®, NEOSAR®); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenoformamida y trimetilmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular, criptoficina 1 y criptoficina

8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatina; mostazas nitrogenadas, tales como clorambucilo, clornafazina, clorofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, uramustina; nitrosoureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos, tales como los antibióticos enodiiinos (por ejemplo, caliqueamicina, caliqueamicina gamma11, caliqueamicina omegal1 (Angew Chem. Int. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dinemicina, dinemicina A; bifosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como el cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos enodiiinos de cromoproteínas relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azerasina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, nemorrubicina, marcelomicina, mitomicinas, tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; agentes antipararrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico, tal como ácido froilínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatratxato; defofamina, demecolcina diaziacuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano, lonidamina; maitansinoides, tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet, pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidracida; procarbacin; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziacuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano, vindesina; dacarbacin; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; capecitabina (XELODA®, Roche); ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides, tales como ácido retinoico; y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

35 También se incluyen en la definición de "agente quimioterápico": (i) agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de las hormonas sobre tumores, tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX®; citrato de tamoxifeno), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON® (citrato de toremifina) y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (DSRE) tales como fulvestrant (FASLODEX®, Astra Zeneca); (ii) inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE® (acetato de megestrol), AROMASIN® (exemestano; Pfizer), formestano, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis) y ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; así como troxacitabina (un análogo nucleosídico de citosina de 1,3-dioxolano); (iv) inhibidores de proteína-cinasa, tales como inhibidores de MEK, tales como cobimetinib (documento WO 2007/044515); (v) inhibidores de lípido-cinasa, tales como taselisib (GDC-0032, Genentech Inc.); (vi) oligonucleótidos de antisentido, en particular los que inhiben la expresión de genes en vías de señalización implicadas en la proliferación anómala de las células, por ejemplo, PKC-alfa, Raf y H-Ras, tales como oblimersén (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozimas, tales como inhibidores de la expresión de VEGF (por ejemplo, ANGIOZYME®) e inhibidores de la expresión de HER2; (viii) vacunas, tales como las vacunas de genoterapia, por ejemplo, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® y VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; inhibidores de topoisomerasa 1, tales como LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) agentes antiangiogénicos, tales como bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); y sales, ácidos y derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

55 También se incluyen en la definición de "agente quimioterápico" anticuerpos terapéuticos, tales como alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (PERJETA™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), trastuzumab emtansina (KADCYLA®, Genentech Inc.) y tositumomab (BEXXAR, Corixa).

65 Un "metabolito" es un producto producido a través del metabolismo en el cuerpo de un compuesto específico o sal del mismo. Los metabolitos de un compuesto se pueden identificar usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica y determinarse sus actividades usando pruebas tales como las descritas en el presente documento. Dichos productos pueden resultar, por ejemplo, de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, desamidación, esterificación, desesterificación, escisión enzimática y similares del compuesto administrado. En consecuencia, la

invención incluye metabolitos de los compuestos de la invención, incluyendo los compuestos producidos mediante un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto de Fórmula I de la presente invención con un mamífero durante un periodo de tiempo suficiente para proporcionar un producto metabólico del mismo.

5 El término “prospecto del envase” se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos.

10 El término “quiral” se refiere a las moléculas que tienen la propiedad de no superponerse al compañero imagen especular, mientras que el término “aquiral” se refiere a las moléculas que son superponibles a su compañero imagen especular.

15 El término “estereoisómeros” se refiere a compuestos que tienen una constitución química idéntica, pero difieren con respecto a la disposición de los átomos o grupos en el espacio.

“Diastereómero” se refiere a un estereoisómero con dos o más centros de quiralidad y cuyas moléculas no son imágenes especulares entre sí. Los diastereómeros tienen diferentes propiedades físicas, por ejemplo, puntos de fusión, puntos de ebullición, propiedades espectrales y reactividades. Las mezclas de diastereómeros se pueden separar bajo procedimientos analíticos de alta resolución, tales como electroforesis y cromatografía.

20 “Enantiómeros” se refieren a dos estereoisómeros de un compuesto que son imágenes especulares no superponibles entre sí.

25 Las definiciones y convenciones estereoquímicas usadas en el presente documento siguen en general S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, Nueva York; y Eliel, E. y Wilen, S., “*Stereochemistry of Organic Compounds*”, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994. Los compuestos de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales y, por lo tanto, existir en diferentes formas estereoisómeras. Se pretende que todas las formas estereoisómeras de los compuestos de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, diastereómeros, enantiómeros y atropoisómeros, así como mezclas de las mismas, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. Muchos compuestos orgánicos existen en formas ópticamente activas, es decir, tienen la capacidad de rotar el plano de la luz polarizada en el plano. Al describir un compuesto ópticamente activo se usan los prefijos D y L, o R y S, para indicar la configuración absoluta de la molécula sobre su(s) centro(s) quiral(es). Los prefijos d y l o (+) y (-) se emplean para designar el signo de rotación de la luz polarizada en un plano por el compuesto, donde (-) o l significa que el compuesto es levógiro. Un compuesto con el prefijo (+) o d es dextrógiro. Para una estructura química dada, estos estereoisómeros son idénticos excepto porque son imágenes especulares entre sí. Un estereoisómero específico también se puede denominar enantiómero, y una mezcla de dichos isómeros a menudo se llama mezcla enantiómera. Una mezcla 50:50 de enantiómeros se denomina mezcla racémica o un racemato, que se puede producir cuando no haya existido estereoselección o estereoespecificidad en una reacción o proceso químico. Los términos “mezcla racémica” y “racemato” se refieren a una mezcla equimolar de dos especies enantiómeras, desprovistas de actividad óptica. Los enantiómeros se pueden separar de una mezcla racémica mediante un procedimiento de separación quiral, tal como cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). La asignación de la configuración en los centros quirales en los enantiómeros separados puede ser provisional, y se puede representar en las estructuras de la Tabla 1 con propósitos ilustrativos, mientras que la estereoquímica se establece definitivamente, tal como a partir de los datos cristalográficos de rayos X.

50 El término “tautómero” o “forma tautómera” se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles por medio de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones por medio de la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante reorganización de algunos de los electrones de enlace.

55 El término “sales farmacéuticamente aceptables” indica sales que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición tanto de ácido como de base. La frase “farmacéuticamente aceptable” indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente compatible con los demás ingredientes comprendidos en una formulación y/o con el mamífero que se trata con la misma.

60 El término “sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable” indica las sales farmacéuticamente aceptables formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido carbónico, ácido fosfórico, y ácidos orgánicos seleccionados de las clases alifática, cicloalifática, aromática, arilalifática, heterocíclica, carboxílica y sulfónica de ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido aspártico, ácido ascórbico, ácido glutámico, ácido antranílico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido embónico, ácido fenilacético, ácido metanosulfónico (“mesilato”), ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico y ácido salicílico.

El término “sal de adición de base farmacéuticamente aceptable” indica las sales farmacéuticamente aceptables formadas con una base orgánica o inorgánica. Los ejemplos de bases inorgánicas aceptables incluyen sales de sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso y aluminio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina y resinas de poliamina.

Un “solvato” se refiere a una asociación o complejo de una o más moléculas de disolvente y un compuesto de la invención. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos incluyen, pero no se limitan a, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

El término “CE<sub>50</sub>” es la “concentración eficaz semimáxima” e indica la concentración plasmática de un compuesto particular requerida para obtener un 50 % del máximo de un efecto particular *in vivo*.

El término “Ki” es la constante de inhibición e indica la afinidad de unión absoluta de un inhibidor particular con respecto a un receptor. Se mide usando ensayos de unión por competición y es igual a la concentración a la que el inhibidor particular ocuparía un 50 % de los receptores si no estuviera presente ningún ligando competitivo (por ejemplo, un radioligando). Los valores de Ki se pueden convertir logarítmicamente en valores de pKi (-log Ki), en los que los valores más altos indican una potencia exponencialmente mayor.

El término “CI<sub>50</sub>” es la concentración inhibidora semimáxima e indica la concentración de un compuesto particular requerida para obtener una inhibición de un 50 % de un proceso biológico *in vitro*. Los valores de CI<sub>50</sub> se pueden convertir logarítmicamente en valores de pCI<sub>50</sub> (-log CI<sub>50</sub>), en los que los valores más altos indican una potencia exponencialmente mayor. El valor de CI<sub>50</sub> no es un valor absoluto, sino que depende de las condiciones experimentales, por ejemplo, las concentraciones empleadas, y se puede convertir en una constante de inhibición absoluta (Ki) usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Biochem. Pharmacol. (1973) 22:3099). Se pueden calcular otros parámetros del porcentaje de inhibición, tales como CI<sub>70</sub>, CI<sub>90</sub>, etc.

Los términos “compuesto de la presente invención” y “compuestos de la presente invención” y “compuestos de Fórmula I” incluyen los compuestos de la Fórmula I y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros, solvatos, metabolitos y sales y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

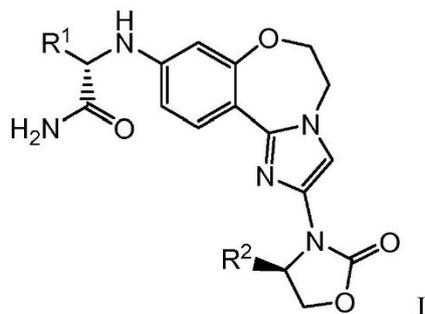
También se pretende que cualquier fórmula o estructura dada en el presente documento, incluyendo los compuestos de Fórmula I, represente hidratos, solvatos y polimorfos de dichos compuestos, y mezclas de los mismos.

También se pretende que cualquier fórmula o estructura dada en el presente documento, incluyendo los compuestos de Fórmula I, represente formas no marcadas, así como formas marcadas isotópicamente de los compuestos. Los compuestos marcados isotópicamente tienen estructuras representadas por las fórmulas dadas en el presente documento, excepto porque uno o más átomos se reemplazan por un átomo que tiene una masa atómica o un número másico seleccionado. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como, pero sin limitarse a, <sup>2</sup>H (deuterio, D), <sup>3</sup>H (tritio), <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>18</sup>F, <sup>31</sup>P, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>36</sup>Cl y <sup>125</sup>I. Diversos compuestos marcados isotópicamente de la presente invención, por ejemplo, aquellos en los que se incorporan isótopos radiactivos, tales como <sup>3</sup>H, <sup>13</sup>C y <sup>14</sup>C. Dichos compuestos marcados isotópicamente pueden ser útiles en estudios metabólicos, estudios cinéticos de reacción, técnicas de detección o de formación de imágenes, tales como tomografía de emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) incluyendo ensayos de distribución en tejido de sustrato o fármaco, o en tratamiento radioactivo de pacientes. Los compuestos terapéuticos de la invención sustituidos o marcados con deuterio pueden tener propiedades de DMPK (metabolismo y farmacocinética de fármacos) mejoradas en relación con la distribución, metabolismo y excreción (ADME). La sustitución por isótopos más pesados, tales como deuterio, puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* incrementada o requisitos de dosificación reducidos. Un compuesto marcado con <sup>18</sup>F puede ser útil para estudios de PET o SPECT. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención y profármacos de los mismos se pueden preparar, en general, llevando a cabo los procedimientos divulgados en los esquemas o en los ejemplos y preparaciones descritos a continuación sustituyendo un reactivo no marcado isotópicamente por un reactivo marcado isotópicamente fácilmente disponible. Además, la sustitución por isótopos más pesados, en particular, deuterio (es decir, <sup>2</sup>H o D) puede proporcionar determinadas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, semivida *in vivo* incrementada o requisitos de dosificación reducidos o una mejora en el índice terapéutico. Se entiende que el deuterio en este contexto se considera un sustituyente en el compuesto de la fórmula (I). La concentración de dicho isótopo más pesado, específicamente deuterio, se puede definir por un factor de enriquecimiento isotópico. En los compuestos de la presente invención, cualquier átomo no

designado específicamente como un isótopo particular pretende representar cualquier isótopo estable de ese átomo. A menos que se indique de otro modo, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene hidrógeno en su composición isotópica de abundancia natural. En consecuencia, en los compuestos de la presente invención, se pretende que cualquier átomo designado específicamente como deuterio (D) represente al deuterio.

#### COMPUESTOS DE BENZOAZEPINA OXAZOLIDINONA

La presente invención proporciona compuestos de benzoxazepina oxazolidinona de Fórmula I, y formulaciones farmacéuticas de los mismos, que son potencialmente útiles en el tratamiento del cáncer, que tienen la estructura:



y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que:

R<sup>1</sup> se selecciona de -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ciclopropilo y ciclobutilo;

R<sup>2</sup> se selecciona de -CH<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F y -CF<sub>3</sub>.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es ciclopropilo.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub> o ciclopropilo.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>2</sup> es -CHF<sub>2</sub>.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>2</sup> es CH<sub>2</sub>F.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es ciclopropilo y R<sup>2</sup> es -CHF<sub>2</sub>.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es ciclopropilo y R<sup>2</sup> es -CH<sub>2</sub>F.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen en los que R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub> y R<sup>2</sup> es -CHF<sub>2</sub>.

Los modos de realización ejemplares de los compuestos de Fórmula I incluyen los compuestos en la Tabla 1.

Los compuestos de Fórmula I de la invención pueden contener centros asimétricos o quirales y, por lo tanto, existir en diferentes formas estereoisómeras. Se pretende que todas las formas estereoisómeras de los compuestos de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a, diastereómeros, enantiómeros y atropoisómeros, así como mezclas de las mismas, tales como mezclas racémicas, formen parte de la presente invención. En algunos casos, la estereoquímica no se ha determinado o se ha asignado provisionalmente.

Además, la presente invención abarca todos los diastereómeros, incluyendo los isómeros *cis-trans* (geométricos) y conformacionales. Por ejemplo, si un compuesto de Fórmula I incorpora un doble enlace o un anillo condensado, las formas *cis* y *trans*, así como mezclas de las mismas, se abarcan dentro del alcance de la invención.

En las estructuras mostradas en el presente documento, si la estereoquímica de cualquier átomo quiral particular no se especifica, entonces todos los estereoisómeros se contemplan e incluyen como los compuestos de la invención. Si la estereoquímica se especifica mediante una cuña sólida o línea punteada que representa una configuración particular, entonces ese estereoisómero se especifica y define así.

Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas, así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, etanol y similares, y se pretende que la invención abarque ambas formas no solvatadas y solvatadas.

Los compuestos de la presente invención también pueden existir en diferentes formas tautómeras y todas dichas formas se abarcan dentro del alcance de la invención. El término "tautómero" o "forma tautómera" se refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles por medio de una barrera de baja energía. Por ejemplo, los tautómeros protónicos (también conocidos como tautómeros prototrópicos) incluyen interconversiones por medio de la migración de un protón, tales como las isomerizaciones ceto-enol e imina-enamina. Los tautómeros de valencia incluyen interconversiones mediante reorganización de algunos de los electrones de enlace.

#### EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Se pueden establecer las eficacias relativas de los compuestos de Fórmula I como inhibidores de una actividad enzimática (u otra actividad biológica) determinando las concentraciones a las que cada compuesto inhibe la actividad en un grado predefinido y, a continuación, comparando los resultados. Típicamente, la determinación preferente es la concentración que inhibe un 50 % de la actividad en un ensayo bioquímico, es decir, la concentración inhibitora al 50 % o "CI<sub>50</sub>". La determinación de los valores de CI<sub>50</sub> se puede lograr usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. En general, se puede determinar una CI<sub>50</sub> midiendo la actividad de una enzima dada en presencia de un intervalo de concentraciones de inhibidor en estudio. A continuación, los valores de la actividad enzimática obtenidos experimentalmente se representan frente a las concentraciones inhibitoras usadas. La concentración del inhibidor que muestra una actividad enzimática de un 50 % (en comparación con la actividad en ausencia de cualquier inhibidor) se toma como el valor de CI<sub>50</sub>. De forma análoga, se pueden definir otras concentraciones inhibitoras a través de determinaciones apropiadas de la actividad. Por ejemplo, en algunos contextos puede ser deseable establecer una concentración inhibitora al 90 %, es decir, CI<sub>90</sub>, etc.

Los compuestos ejemplares de Fórmula I de la Tabla 1 se prepararon, caracterizaron y sometieron a prueba para determinar la unión a diversas isoformas y formas mutantes de PI3K de acuerdo con los procedimientos de la presente invención, y tienen las siguientes estructuras, denominaciones correspondientes (ChemBioDraw, Versión 12.0.2, CambridgeSoft Corp., Cambridge MA) y actividad biológica. Cuando más de un nombre esté asociado con un compuesto o intermedio de Fórmula I, la estructura química definirá el compuesto.

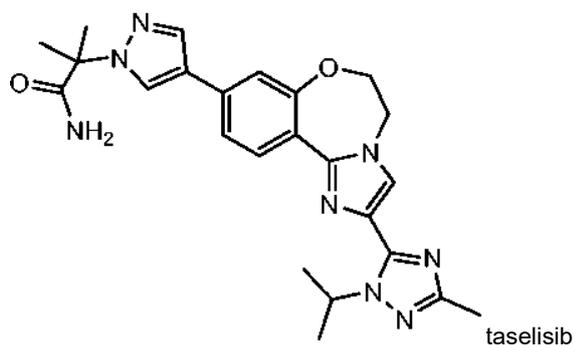
Tabla 1. Compuestos de Fórmula I

N.º	Estructura	Denominación
101		(S)-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[ <i>f</i> ]imidazo[1,2- <i>d</i> ][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida
102		(S)-2-ciclobutil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[ <i>f</i> ]imidazo[1,2- <i>d</i> ][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida

N.º	Estructura	Denominación
103		(S)-2-ciclopropil-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida
104		(S)-2-ciclopropil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida
105		(S)-2-ciclopropil-2-((2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida
106		(S)-2-((2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida
107		(S)-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)butanamida

## TASELISIB

- 5 El compuesto conocido como taselisib, GDC-0032 y Roche RG7604 (n.º CAS 1282512-48-4, Genentech Inc.), tiene un nombre IUPAC: 2-(4-(2-(1-isopropil-3-metil-1H-1,2,4-triazol-5-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)-1H-pirazol-1-il)-2-metilpropanamida y la estructura:

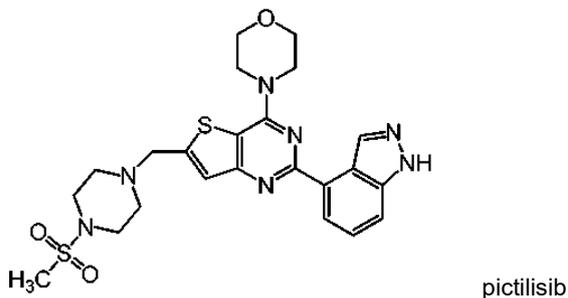


incluyendo estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 Taselesib se puede preparar y caracterizar como se describe en los documentos WO 2011/036280, US 8242104 y US 8343955.

#### PICTILISIB

- 10 El compuesto conocido como pictilisib, GDC-0941, Roche RG-7321 y pictrelisib (n.º CAS 957054-30-7, Genentech Inc.) es un potente inhibidor (universal) de clase I multidiaria de isoformas de PI3K. GDC-0941 se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de tumores sólidos avanzados. GDC-0941 se denomina 4-(2-(1H-indazol-4-il)-6-((4-(metilsulfonil)piperazin-1-il)metil)tieno[3,2-d]pirimidin-4-il)morfolina (documento US 7781433; documento US 7750002; Folkes *et al.* (2008) *Jour. of Med. Chem.* 51(18):5522-5532) y
- 15 tiene la estructura:



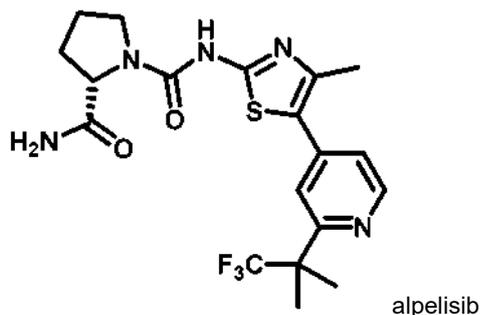
incluyendo estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

20

#### ALPELISIB

- El compuesto conocido como alpelisib (BYL719, Novartis, n.º CAS 1217486-61-7) es un inhibidor selectivo oral de la isoforma alfa de PI3K y se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento potencial de una variedad de tipos
- 25 de tumores, incluyendo un estudio de fase III en combinación con fulvestrant para el tratamiento de segunda línea del cáncer de mama metastásico avanzado sin expresión de HER2 y con expresión de receptor de hormonas (Furet, P. *et al.* (2013) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23:3741-3748; documento US 8227462; documento US 8476268; documento US 8710085). Alpelisib se denomina (S)-N1-(4-metil-5-(2-(1,1,1-trifluoro-2-metilpropan-2-il)piridin-4-il)tiazol-2-il)pirrolidin-1,2-dicarboxamida y tiene la estructura:

30



#### INHIBICIÓN BIOQUÍMICA DE LAS ISOFORMAS DE PI3K

La capacidad de un compuesto de la invención para actuar como un inhibidor de PI3K $\alpha$  con selectividad sobre PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$  y PI3K $\gamma$  se determinó usando los procedimientos del Ejemplo 901. Los valores de  $K_i$  que se muestran en las Tablas 2A y 2B representan la media geométrica de un mínimo de tres experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo.

La Tabla 2A muestra la inhibición bioquímica de cuatro isoformas de PI3K por los compuestos de Fórmula I de la Tabla 1. Además, se incluyen dos compuestos de PI3K clínicamente probados, taselisib y pictilisib, como comparadores. Los compuestos representativos de la invención presentan una fuerte actividad contra PI3K $\alpha$ , y presentan una selectividad significativamente potenciada con respecto a las otras isoformas PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$  y PI3K $\gamma$  en comparación con taselisib (GDC-0032) y pictilisib (GDC-0941). En particular, los cocientes de selectividad en la segunda columna por la derecha de la Tabla 2A muestran que cada compuesto de Fórmula I **101-107** tiene un cociente de selectividad por PI3K alfa frente a delta mucho mayor que taselisib o pictilisib. De hecho, tanto taselisib como pictilisib tienen una actividad más fuerte contra PI3K delta que contra PI3K alfa, es decir, sus cocientes de selectividad son inferiores a 1. Los cocientes de selectividad de los compuestos de Fórmula I **101-107** varían de 301 veces a 634 veces.

La Tabla 2B muestra la inhibición bioquímica de dos isoformas de PI3K, alfa y delta, y los cocientes de selectividad por PI3K alfa frente a delta para determinados compuestos de comparación del documento US 8242104, y un compuesto que tiene un grupo dimetiloxazolidin-2-ona del documento US 8263633 (Compuesto 356, columna 149). Los compuestos de comparación que se muestran aquí en la Tabla 2B son ejemplos de los géneros generales descritos en cada uno de los documentos US 8242104 y US 8263633. Ni el documento US 8242104 ni el documento US 8263633 divulgan un compuesto dentro del alcance de los compuestos de Fórmula I de la invención. Mientras que los ejemplos comparativos representativos del documento US 8242104 como se describe en la Tabla 2B demuestran cocientes de selectividad por PI3K $\alpha$  (alfa) frente a PI3K $\delta$  (delta)  $>1$ , el cociente de selectividad máximo observado es de 46,9 veces. Los compuestos de Fórmula I **101-107**, por lo tanto, alcanzan cocientes de selectividad significativamente mayores que los ejemplos del documento US 8242104. No existe ninguna orientación en los documentos US 8242104 o US 8263633 sobre cómo realizar la selección de elementos estructurales de los compuestos de Fórmula I para lograr la propiedad de alta selectividad por PI3K alfa frente a PI3K delta. Esta propiedad inesperada de una selectividad por PI3K alfa 300 veces mayor se conserva en todo el espectro de los compuestos ejemplificados en la Tabla 1.

Los inhibidores de PI3K actuales en ensayos clínicos, tales como taselisib (documento WO 2011/036280; documento US 8242104; documento US 8343955) y otros ejemplos representativos del documento US 8242104 presentan una actividad significativa contra la isoforma PI3K $\delta$  (delta). Esta falta de selectividad frente a PI3K $\delta$  (delta) es consecuente con la toxicidad gastrointestinal observada en el entorno clínico para taselisib. Existe la necesidad de inhibidores de PI3K $\alpha$  (alfa) que contengan las características favorables representativas de los ejemplos del documento US 8242104 y que carezcan simultáneamente de actividad contra PI3K $\delta$  (delta). La presente invención proporciona compuestos que cumplen con este perfil de actividad y selectividad.

La propiedad inesperada de selectividad por PI3K alfa es ventajosa para eliminar la toxicidad gastrointestinal observada en candidatos clínicos de inhibidores de PI3K. Datos clínicos recientes con inhibidores de PI3K han implicado la actividad contra PI3K delta como fuente de toxicidades gastrointestinales (Akinleye *et al.*, "Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitors as cancer therapeutics" *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:88-104). Véanse en la Tabla 2 los inhibidores de PI3K en ensayos clínicos, taselisib y pictilisib.

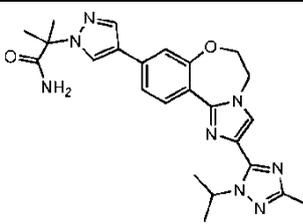
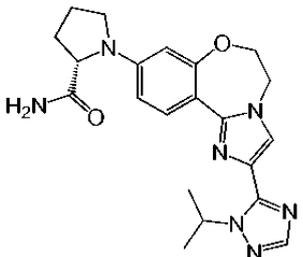
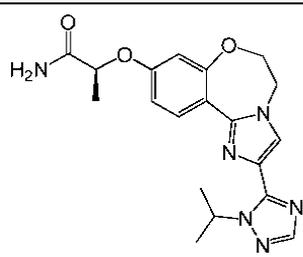
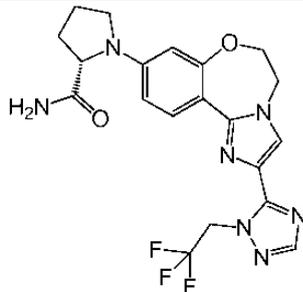
Con una selectividad significativamente mayor para la inhibición de PI3K $\alpha$  (alfa) en relación con la inhibición de PI3K $\delta$  (delta), se esperaría que los compuestos de Fórmula I 101-107 logren un mayor margen entre la actividad clínica derivada de la inhibición de PI3K $\alpha$  (alfa) en relación con las toxicidades derivadas de la inhibición de PI3K $\delta$  (delta), en comparación con el taselisib y pictilisib clínicamente probados o con cualquiera de los ejemplos de los documentos US 8242104 o US 8263633. En consecuencia, los compuestos de Fórmula I de la invención pueden ser útiles como agentes terapéuticos con un perfil de toxicidad disminuido con respecto a los agentes que presentan una mayor inhibición de las funciones normales de PI3K $\beta$ , PI3K $\delta$  o PI3K $\gamma$ .

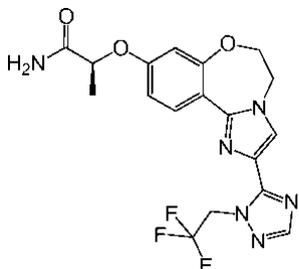
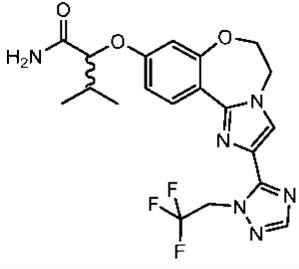
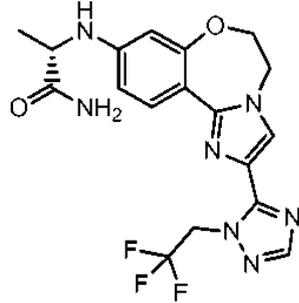
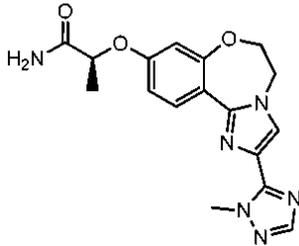
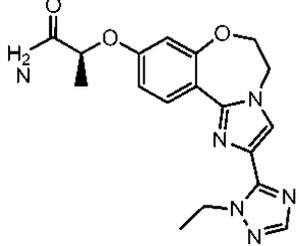
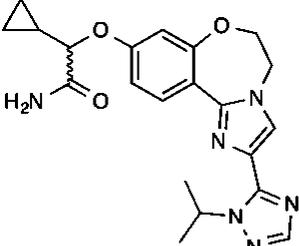
Tabla 2A. Inhibición bioquímica de las isoformas de PI3K por los compuestos de Fórmula I y los compuestos de comparación taselisib y pictilisib

N.º de compuesto	$K_i$ PI3K $\alpha$ (nM)	$K_i$ PI3K $\beta$ (nM)	$K_i$ PI3K $\delta$ (nM)	$K_i$ PI3K $\gamma$ (nM)	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K- $\beta$	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\delta$	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\gamma$
taselisib GDC-0032	0,090	53,0	0,079	1,43	591	0,9	16,0
pictilisib GDC-0941	2,56	70,2	1,54	41,8	27,4	0,6	16,3

N.º de compuesto	Ki PI3K $\alpha$ (nM)	Ki PI3K $\beta$ (nM)	Ki PI3K $\delta$ (nM)	Ki PI3K $\gamma$ (nM)	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K- $\beta$	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\delta$	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\gamma$
101	0,034	99,7	12,2	18,2	2944	361	537
102	0,949	>1000	286	708	>1054	301	746
103	0,060	335	37,7	49,0	5640	634	824
104	0,464	813	197	289	1750	425	622
105	0,051	341	30,3	36,4	6718	598	717
106	0,040	122	16,7	17,8	3050	416	444
107	0,048	132	17,5	23,7	2782	368	499

Tabla 2B. Inhibición bioquímica de las isoformas de PI3K por compuestos de comparación

N.º (doc. US 8242104)	Estructura	Ki PI3K $\alpha$ (nM)	Ki PI3K $\delta$ (nM)	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\delta$
196 taselisib GDC-0032		0,090	0,079	0,88
375		0,016	0,417	21,7
436		0,35	6,94	22,3
469		<0,02*	0,39*	19,3

N.º (doc. US 8242104)	Estructura	Ki PI3K $\alpha$ (nM)	Ki PI3K $\delta$ (nM)	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\delta$
486		0,186**	2,5**	13,4
501		3,56**	21,8**	6,1
529		0,023	1,05	46,9
540		2,72**	24,1**	8,8
544		0,437**	11,3**	25,8
549 (estereoisómero 1 separado)		0,56**	9,41**	17,0

N.º (doc. US 8242104)	Estructura	Ki PI3K $\alpha$ (nM)	Ki PI3K $\delta$ (nM)	Selectividad por PI3K $\alpha$ frente a PI3K $\delta$
549 (estereoisómero 2 separado)		5,66**	1,70**	0,30
550		0,107	1,96	19,4
356 (doc. US 8263633)		0,967**	0,92**	0,95

\* El valor de Ki representa el promedio de dos experimentos, \*\* El valor de Ki representa un solo experimento

#### INTERACCIONES DE LOS COMPUESTOS CON PI3K

5

Una base racional para la selectividad de PI3K $\alpha$  por los compuestos de Fórmula I puede residir en determinadas interacciones de unión.

La capacidad de un compuesto de la invención para interactuar específicamente con PI3K $\alpha$  se determinó resolviendo la estructura de cocrisales de rayos X de compuestos representativos con PI3K $\alpha$  (alfa) usando los procedimientos del Ejemplo 908. El diseño estructural optimizado de inhibidores de PI3K con selectividad por la isoforma PI3K $\alpha$  sobre otras isoformas puede incluir un posicionamiento y disposición precisos de átomos y grupos funcionales para interactuar con residuos específicos de isoforma en el sitio de unión. En particular, se encontró que la sustitución en la posición 9 y en la posición 2 del sistema de anillo de 5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina tiene un impacto crítico sobre la actividad específica de los compuestos contra PI3K $\alpha$ .

15

Las Figuras 1A-D muestran las estructuras de cocrisales de rayos X de tasisib (GDC-0032), el compuesto de referencia 529 (documento US 8242104) y dos compuestos representativos de la invención con PI3K $\alpha$ . Como se muestra en la Figura 1A, tasisib (GDC-0032) contiene un grupo funcional amida primaria que está situado en estrecho contacto con Gln859 y Ser854, lo que parece ofrecer la posibilidad de que se produzcan interacciones de enlace de hidrógeno. El residuo Gln859 es específico de la isoforma PI3K $\alpha$ , con un residuo diferente ocupando esta posición en las otras isoformas (PI3K $\beta$  = Asp, PI3K $\delta$  = Asn, PI3K $\gamma$  = Lys). Sin embargo, a pesar de este estrecho contacto con un residuo específico de PI3K $\alpha$ , medido en un ensayo bioquímico, GDC-0032 tiene la misma actividad contra ambas isoformas PI3K $\alpha$  y PI3K $\delta$ , y solo una actividad ligeramente reducida contra la isoforma PI3K $\gamma$  (véase la Tabla 2A).

25

Como se muestra en la Figura 1B, el compuesto de referencia 529 (documento US 8242104) contiene un grupo funcional amida primaria en una posición similar a la de tasisib. Esta funcionalidad está a la distancia apropiada y con la geometría apropiada de Ser854 y Gln859 para que se produzcan interacciones de enlace de hidrógeno. El cociente de selectividad de 46,9 veces por PI3K $\alpha$  con respecto a PI3K $\delta$  (véase la Tabla 2B) se puede racionalizar en vista de estas interacciones, y del conocimiento de que PI3K $\delta$  no contiene un residuo de Gln en la posición 859 y, por lo tanto, estas interacciones deberían ser específicas de PI3K $\alpha$ .

30

Las Figuras 1C y 1D muestran que la amida primaria del grupo (S)-2-aminopropanamida del Compuesto 101 y el grupo (S)-2-amino-2-ciclopropilacetamida del Compuesto 103 ocupan cada uno un lugar muy similar en el sitio de unión a las amidas primarias de GDC-0032 y el compuesto de referencia 529 (documento US 8242104). Esta funcionalidad de amida primaria en cada compuesto representativo de la invención está a la distancia apropiada y con la geometría apropiada de Ser854 y Gln859 para que se produzcan interacciones ideales de enlace de hidrógeno. A pesar de las aparentes similitudes en cuanto a la colocación y orientación de los grupos funcionales, los ejemplos representativos ilustrados en las Figuras 1C y 1D, así como otros compuestos de la presente invención con sustituyentes y funcionalidad similares, mejoran las interacciones de la amida primaria de taselisib y del compuesto de referencia 529 (documento US 8242104), de modo que se observa que los compuestos de la presente invención tienen una selectividad sustancialmente incrementada por PI3K $\alpha$  con respecto a PI3K $\delta$ , medida en un ensayo bioquímico. El Compuesto 101 es 361 veces más selectivo y el Compuesto 103 es 634 veces más selectivo, un incremento sustancial con respecto al compuesto de referencia 529 (documento US 8242104), que es solo 46,9 veces más selectivo. En vista del similar posicionamiento de la funcionalidad amida primaria entre taselisib y otros compuestos del documento US 8242104 (como se ejemplifica por el compuesto de referencia 529), la selectividad incrementada por PI3K $\alpha$  con respecto a PI3K $\delta$ , como se demuestra por los compuestos de la presente invención, es una propiedad inesperada. No existe ninguna orientación en el documento US 8242104 sobre cómo realizar la selección de elementos estructurales de los compuestos de Fórmula I para lograr la propiedad de alta selectividad por PI3K $\alpha$  (>300 veces). Los compuestos de Fórmula I de la invención mejoran las interacciones de la amida primaria de GDC-0032, de modo que se observa que los compuestos de la presente invención tienen una selectividad sustancialmente incrementada por PI3K $\alpha$  con respecto a PI3K $\delta$ , medida en un ensayo bioquímico en relación con los compuestos de comparación (véanse las Tablas 2A y 2B)

La Figura 2A muestra una estructura de rayos X de taselisib unido en el sitio activo de PI3K $\alpha$  (alfa). El átomo N2 del anillo de triazol no puede interactuar directamente con la cadena lateral de la Tyr836 (distancia de 4,04 Å) ni con la Ser774 (distancia de 2,74 y 2,82 Å, sin polaridad complementaria entre el ligando y el residuo). La Figura 2B muestra una estructura de rayos X del Compuesto 101 unido en el sitio activo de PI3K $\alpha$ , y muestra que el anillo de oxazolidinona puede realizar múltiples interacciones mejoradas con la proteína con respecto al anillo de triazol. La funcionalidad carbonilo está cerca de la cadena lateral de la Tyr836 (2,67 Å) y puede establecer una interacción polar favorable. Un átomo de flúor del sustituyente de oxazolidinona está en estrecho contacto (2,21 Å) con el grupo hidroxilo de la Ser774 y es consecuente con una interacción polar o un enlace de hidrógeno no clásico, una interacción favorable habilitada por la polarización del enlace carbono-flúor (Böhm *et al.*, Fluorine in Medicinal Chemistry, (2004) ChemBioChem, 5:637-643; Zhou *et al.*, "Fluorine Bonding - How Does it Work In Protein-Ligand Interactions", (2009) J. Chem. Inf. Model. 49:2344-2355).

Todos los compuestos de la invención contienen un anillo de oxazolidinona y pueden lograr la interacción mejorada con la Tyr836 de PI3K $\alpha$  (alfa). Algunos ejemplos de la invención también contienen un sustituyente fluorado en el anillo de oxazolidinona y pueden lograr una interacción mejorada con la Ser774 de PI3K $\alpha$ . Ambas interacciones de unión pueden contribuir a potenciar la selectividad por PI3K $\alpha$  observada para los ejemplos de la invención con respecto a los ejemplos del documento US 8242104. Como se muestra en las Tablas 2A y 2B, los compuestos que contienen el anillo de oxazolidinona tienen una mayor selectividad por las isoformas que los compuestos comparables que contienen el anillo de triazol. Los residuos Ser774 y Tyr836 no son exclusivos de la isoforma PI3K $\alpha$ , la PI3K $\delta$  contiene estos mismos residuos en las mismas posiciones y estas estructuras cristalinas no predicen la selectividad potenciada por las isoformas de los inhibidores de oxazolidinona. Las diferencias sutiles en cuanto al posicionamiento y la orientación de la misma identidad de residuos entre diferentes isoformas pueden ser el resultado de cambios sutiles en la estructura proteica secundaria y terciaria. Estas diferencias son difíciles de predecir e interpretar, incluso frente a las estructuras cristalinas de rayos X de ambas isoformas de proteínas. Las sorprendentes e inesperadas propiedades de mejora de las interacciones moleculares y de selectividad potenciada por las isoformas de los inhibidores de oxazolidinona se conservan en todo el espectro de los compuestos ejemplificados en la Tabla 1.

La oxazolidinona se diferencia estructuralmente del triazol en que la oxazolidinona tiene un carbonilo, es más polar y no tiene carácter aromático. El triazol no tiene un grupo carbonilo, es menos polar y tiene carácter aromático.

El anillo de oxazolidinona proporciona un beneficio adicional con respecto al anillo de triazol en términos de un incrementado carácter sp<sup>3</sup> y un reducido recuento de anillos aromáticos. En general, se acepta en la literatura que un mayor número de anillos aromáticos se correlaciona con un riesgo incrementado de unión promiscua. Por el contrario, un incremento de la fracción de carbonos sp<sup>3</sup> (n.º de carbonos sp<sup>3</sup> / n.º total de carbonos) se correlaciona con propiedades fisicoquímicas mejoradas y con disminución de la unión promiscua, disminuyendo el riesgo de toxicidad colateral. Estos conceptos se describen en las referencias Lovering *et al.*, "Escape From Flatland", (2009) J. Med. Chem., 52:6752-6756 y Ritchie y Macdonald, "Physicochemical Descriptors of Aromatic Character and Their Use in Drug Discovery", (2014) J. Med. Chem. 57:7206-7215. El reemplazo del anillo aromático de triazol como lo ejemplifican los compuestos representativos del documento US 8242104 por un anillo heterocíclico saturado, la oxazolidinona contenida en cada ejemplo de la invención, representa una disminución favorable del riesgo de toxicidad colateral. La totalidad de los compuestos ejemplificados en el documento US 8242104 están abrumadoramente poblados por compuestos con anillos aromáticos en esta posición, con 4 ejemplos de un grupo

funcional de carboxamida que reemplaza el anillo aromático y ningún ejemplo de sistemas cíclicos o heterocíclicos saturados. Debido a las interacciones de unión significativamente diferentes y a los requisitos estéricos de los heterociclos aromáticos y saturados, en general no son intercambiables. Sin ejemplos de sistemas heterocíclicos saturados en la posición 2 del anillo de 5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepina, el documento US 8242104 no proporciona ninguna orientación sobre un procedimiento para reemplazar el anillo aromático por un heterociclo saturado mientras que retiene la actividad contra PI3K $\alpha$ .

En consecuencia, los compuestos de la invención contienen sustituyentes y funcionalidad optimizados tanto en la 5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepina en la posición 9 como en la posición 2. Estos compuestos optimizados proporcionan un beneficio significativo y hasta ahora desconocido con respecto a las interacciones moleculares mejoradas y una actividad selectiva incrementada contra PI3K $\alpha$ , con una actividad reducida contra PI3K $\delta$ . Los compuestos de la invención pueden ser útiles como agentes terapéuticos con una ventana terapéutica potenciada en relación con agentes relacionados tales como taselisib (GDC-0032).

#### INHIBICIÓN SELECTIVA DE PI3K $\alpha$ (ALFA) MUTANTE

La capacidad de un compuesto de la invención de actuar preferentemente contra células que contienen PI3K $\alpha$  mutante se determinó midiendo la inhibición de la vía de PI3K en líneas celulares isogénicas SW48: PI3K $\alpha$  natural (original), con mutación E545K de dominio helicoidal y con mutación H1047R de dominio cinasa, como se describe en los procedimientos del Ejemplo 902.

Análisis estadístico: Los valores de CE<sub>50</sub> representan la media geométrica de un mínimo de 4 experimentos independientes, a menos que se indique de otro modo. Todas las estadísticas se realizaron con el programa informático KaleidaGraph (versión 4.1.3). Se realizó una prueba de la *t* de Student utilizando datos no emparejados con la misma varianza para comparar la actividad contra las células mutantes y las células naturales.  $P < 0,05$  se considera significativo.

La Tabla 3A muestra la inhibición de P-PRAS40 en células isogénicas SW48 por los compuestos de Fórmula I de la Tabla 1. Todos estos compuestos muestran una actividad incrementada contra las células con PI3K $\alpha$  mutante en relación con las células con PI3K $\alpha$  natural. Los compuestos de la invención muestran una actividad similar al taselisib en células SW48 con PI3K $\alpha$  mutante, con una selectividad igual a o mayor que taselisib con respecto a la actividad en las células con PI3K $\alpha$  natural (véase la Tabla 3B).

La Tabla 3B muestra la inhibición de P-PRAS40 en células isogénicas SW48 por determinados compuestos de comparación del documento US 8242104, un compuesto que lleva un grupo dimetiloxazolidin-2-ona del documento US 8263633 (Compuesto 356, columna 149), y pictilisib. Los compuestos de comparación que se muestran aquí en la Tabla 3B son ejemplos de los géneros generales descritos en cada uno de los documentos US 8242104 y US 8263633. Ni el documento US 8242104 ni el documento US 8263633 divulgan un compuesto dentro del alcance de los compuestos de Fórmula I de la invención. Los compuestos de comparación contienen ejemplos que no tienen una actividad significativamente incrementada contra las células con PI3K $\alpha$  mutante en relación con las células con PI3K $\alpha$  natural (véanse los compuestos de comparación 436 y 549,  $p > 0,05$ ). Estos compuestos son muy similares estructuralmente a los compuestos de comparación que presentan una actividad significativamente incrementada contra las células con PI3K $\alpha$  mutante en relación con las células con PI3K $\alpha$  natural (véase el compuesto de comparación 529). No existe ningún elemento estructural común dentro de los compuestos de comparación que proporcione orientación sobre la inhibición selectiva de las células con PI3K $\alpha$  (alfa) mutante. En términos más generales, no existe ninguna orientación en los documentos US 8242104 o US 8263633 sobre cómo realizar la selección de elementos estructurales de los compuestos de Fórmula I para lograr una actividad incrementada o equivalente contra las células con PI3K $\alpha$  mutante en relación con las células con PI3K $\alpha$  natural. Esta propiedad inesperada se conserva en todo el espectro de los compuestos ejemplificados en la Tabla 1.

Tabla 3A. Inhibición de P-PRAS40 en células isogénicas SW48 por los compuestos de Fórmula I

N.º	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48(E545K) (µM)	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48(H1047R) (µM)	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48 (original) (µM)	Factor de selectividad por SW48(E545K) frente a SW48 (original)	Factor de selectividad por SW48(H1047R) frente a SW48 (original)
101	0,0027	0,0030	0,0063	2,4 (p<0,001)	2,1 (p=0,002)
102	0,0335	0,0358	0,0849	2,5 (p=0,002)	2,4 (p=0,001)
103	0,0041	0,0038	0,0101	2,5 (p<0,001)	2,6 (p<0,001)
104	0,0200	0,0228	0,0618	3,1 (p=0,007)	2,7 (p=0,009)
105	0,0042	0,0048	0,0125	3,0 (p=0,007)	2,6 (p=0,007)
106	0,0045	0,0044	0,0115	2,5 (p=0,003)	2,6 (p=0,001)
107	0,0053	0,0052	0,0108	2,0 (p=0,003)	2,1 (p=0,003)

Tabla 3B. Inhibición de P-PRAS40 en células isogénicas SW48 por compuestos de comparación

5

Compuesto o N.º (doc. US 8242104)	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48(E545K) (µM)	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48(H1047R) (µM)	CE <sub>50</sub> de P-PRAS40 SW48 (original) (µM)	Factor de selectividad por SW48(E545K) frente a SW48 (original)	Factor de selectividad por SW48(H1047R) frente a SW48 (original)
196 taselisib GDC-0032	0,0034	0,0040	0,0079	2,3 (p<0,001)	2,0 (p<0,001)
pictilisib GDC-0941	0,0284	0,0321	0,0315	1,1 (p=0,7)	1,0 (p=0,9)
436 GDC-0326	0,0095	0,0092	0,0128	1,3 (p=0,26)	1,4 (p=0,22)
529	0,0008	0,0009	0,0016	2,2 (p<0,001)	2,0 (p=0,002)
549 (estereoisómero 1 separado)	0,0105*	0,0147*	0,0119*	1,1	0,8

\* CE<sub>50</sub> representa un solo experimento

## ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA EN CÉLULAS TUMORALES CON PI3K MUTANTE

10

La capacidad de un compuesto de la invención para actuar sobre células tumorales con PI3K mutante se determinó midiendo el CE<sub>50</sub> de viabilidad celular en células HCC1954 (PI3Kα con mutación H1047R) y células MCF7 (PI3Kα con mutación E545K) usando los procedimientos del Ejemplo 903. La Tabla 4 muestra que los compuestos representativos de Fórmula I 101 y 103 de la invención pueden inhibir la vía de PI3K e inhibir la proliferación en células HCC1954 y células MCF7 con un nivel de potencia similar al de los compuestos de comparación taselisib (compuesto 196, documento US 8242104), pictilisib y compuesto 436 (documento US 8242104).

15

Tabla 4. Actividad antiproliferativa de los compuestos contra PI3K en células tumorales con PI3K-alfa mutante

Compuesto o n.º	CE <sub>50</sub> antiproliferativa de HCC1954 (µM)	CE <sub>50</sub> antiproliferativa de MCF7 (µM)
taselisib 196 (doc. US 8242104) GDC-0032	0,04	0,02
pictilisib GDC-0941	0,75	0,12
436 (doc. US 8242104)	0,35	0,09
101	0,06	0,03
103	0,07	0,03

20

EFICACIA *IN VIVO*

Las Tablas 5-8 muestran datos de estudios de inhibición del crecimiento tumoral (ICT) *in vivo* con compuestos contra PI3K. El cambio en el volumen del tumor se midió durante 20 días o más en cohortes de ratones

inmunodeficientes con xenoinjertos de cáncer de mama, a los que se les administró diariamente por administración PO (oral) un vehículo y compuestos contra PI3K (Ejemplo 904).

5 La Tabla 5 muestra que, a las dosis máximas toleradas (DMT), GDC-0032 (taselisib), el Compuesto 103 y el Compuesto 101 son cada uno más eficaces que alpelisib (BYL-719) en un modelo de tumor con PI3K mutante.

10 La Tabla 6 muestra que, a dosis menores que la dosis máxima tolerada (es decir, 25 mg/kg), el Compuesto 101 es más eficaz que GDC-0032 en un modelo de tumor con PI3K mutante. Existe la posibilidad de un mayor índice terapéutico (IT) con el Compuesto 101, ya que se alcanza la eficacia máxima antes que la tolerabilidad máxima.

La Tabla 7 muestra que, a las dosis máximas toleradas, se observan respuestas incrementadas (RP y RC) con el Compuesto 101 en comparación con GDC-0032 en un modelo de tumor con PI3K mutante. Además, a las dosis máximas toleradas, GDC-0032 y BYL-719 son igualmente eficaces.

15 La Tabla 8 muestra que, a las dosis máximas toleradas, GDC-0032 y el Compuesto 101 son más eficaces que BYL-719, y que el Compuesto 101 es aproximadamente tan eficaz como GDC-0032 en un modelo de tumor con PI3K mutante.

20 Tabla 5. Comparación de las dosis máximas toleradas (DMT) de compuestos contra PI3K en el modelo de xenoinjerto de mama HCC-1954x1 (RE-, PI3K<sup>H1047R</sup>)

Compuesto contra PI3K	% de ICT	RP	RC
BYL-719, 40 mg/kg QD, PO	80	1	1
GDC-0032, 15 mg/kg QD, PO	118	4	0
Compuesto 103, 100 mg/kg QD, PO	120	4	3
Compuesto 101, 50 mg/kg QD, PO	129	10	0

25 Tabla 6. Estudio de determinación de dosis del Compuesto 101 en el modelo de xenoinjerto de mama HCC-1954x1 (RE-, PI3K<sup>H1047R</sup>)

Compuesto contra PI3K	% de ICT	RP	RC
Compuesto 101, 0,5 mg/kg QD, PO	19	0	0
Compuesto 101, 1 mg/kg PO, QD	60	2	0
Compuesto 101, 2,5 mg/kg PO, QD	68	1	0
Compuesto 101, 5 mg/kg PO, QD	84	0	0
Compuesto 101, 25 mg/kg PO, QD	140	7	0
Compuesto 101, 50 mg/kg PO, QD	149	6	0
GDC-0032, 15 mg/kg PO, QD	111	2	0

Tabla 7. Estudio de determinación de dosis del Compuesto 101 en el modelo de xenoinjerto de mama KPL-4 (RE-, PI3K<sup>H1047R</sup>)

Compuesto contra PI3K	% de ICT	RP	RC
Compuesto 101, 1 mg/kg PO, QD	28	0	0
Compuesto 101, 2,5 mg/kg PO, QD	86	1	0
Compuesto 101, 5 mg/kg PO, QD	93	1	0
Compuesto 101, 15 mg/kg PO, QD	125	5	0
Compuesto 101, 25 mg/kg PO, QD	135	9	0
Compuesto 101, 50 mg/kg PO, QD	153	9	1
GDC-0032, 15 mg/kg PO, QD	113	3	0

30 Tabla 8. Comparación de GDC-0032, Compuesto 101 y BYL-719 en el modelo de xenoinjerto PDX de mama HCl-003 (RE+, PI3K<sup>H1047R</sup>)

Compuesto contra PI3K	% de ICT	RP	RC
BYL-719, 40 mg/kg PO, QD	114	2	0
GDC-0032, 15 mg/kg PO, QD	162	6	1
Compuesto 101, 50 mg/kg PO, QD	175	5	2

## INHIBICIÓN DE LA VÍA EN LINFOCITOS B AISLADOS

5 La capacidad de un compuesto de la invención de inhibir la vía de PI3K en linfocitos B se evaluó por la influencia de los compuestos sobre los niveles de CD69 después del tratamiento agonista con a-IgM usando los procedimientos del Ejemplo 906. Se cree que la expresión de CD69 en linfocitos B resultante del tratamiento con a-IgM está dirigida por la señalización a través de PI3K $\delta$  (delta). La Tabla 9 muestra que los compuestos representativos de Fórmula I son inhibidores más selectivos de la señalización de la vía de PI3K en una línea con PI3K mutante (SW48(H1047R)) frente a linfocitos B (columna 3) en comparación con taselisib, pictilisib, alpelisib, compuesto 436 (documento US US8242104) e idelalisib.

10 Tabla 9. Inhibición de la expresión de CD69 en linfocitos B por compuestos seleccionados.

N.º	CI <sub>50</sub> de expresión de CD69 a-IgM de linfocitos B ( $\mu$ M), unión a proteínas plasmáticas corregida*	[CI <sub>50</sub> de expresión de CD69 a-IgM de linfocitos B, unión a proteínas plasmáticas corregida*] / [CE <sub>50</sub> p-PRAS40 SW48(H1047R)]
<b>101</b>	0,047	16
<b>103</b>	0,076	20
taselisib	0,00031	0,077
pictilisib	0,006	0,19
alpelisib	0,048	0,79
Compuesto 436 (doc. US 8242104)	0,020	2,2
idelalisib	0,048	< 0,048

15 \* CI<sub>50</sub> de expresión de CD69 medida en sangre completa humana y corregida multiplicando por la F<sub>u</sub> humana medida de un experimento de unión a proteínas plasmáticas.

## INHIBICIÓN DE LA VÍA EN CÉLULAS TUMORALES CON PI3K NATURAL Y MUTANTE

20 La capacidad de un compuesto de la invención de inhibir la señalización de la vía de PI3K en células tumorales se evaluó midiendo los niveles de p-PRAS40 en las líneas celulares HCC1954 (PI3K $\alpha$  con mutación H1047R) y HDQ-P1 (PI3K $\alpha$  natural), usando los procedimientos del Ejemplo 907. La Tabla 10 muestra que los compuestos representativos de Fórmula 1 **101**, **103** y **105** pueden inhibir selectivamente la vía de PI3K en células tumorales con PI3K $\alpha$  mutante (HCC1954, PI3K $\alpha$  con mutación H1047R) frente a células tumorales con PI3K $\alpha$  natural (HDQ-P1, PI3K $\alpha$  natural). Los compuestos **101**, **103** y **105** tienen una mayor selectividad por el mutante frente a la forma natural que los compuestos de comparación taselisib, pictilisib, alpelisib y el compuesto 436 (documento US 8242104).

25 Tabla 10. Inhibición de p-PRAS40 en líneas HCC1954 y HDQ-P1 por compuestos seleccionados.

N.º	CE <sub>50</sub> P-PRAS40 HCC1954 MSD ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> P-PRAS40 HDQ-P1 MSD ( $\mu$ M)	Factor de selectividad por HCC1954 frente a HDQ-P1
<b>101</b>	0,019	0,084	4,4
<b>103</b>	0,028	0,155	5,5
<b>105</b>	0,027	0,179	6,6
taselisib	0,023	0,055	2,4
pictilisib	0,324	0,094	0,3
alpelisib	0,483	0,311	0,6
Compuesto 436 (doc. US 8242104)	0,089	0,122	1,4

DEGRADACIÓN DE p110 $\alpha$  EN CÉLULAS TUMORALES CON PI3K MUTANTE

35 La capacidad de un compuesto de la invención de disminuir los niveles de p110 $\alpha$  se determinó en experimentos con las líneas celulares HCC1954 (PI3K $\alpha$  con mutación H1047R) y HDQ-P1 (PI3K $\alpha$  natural), usando los procedimientos del Ejemplo 905. Las Figuras 3A y 3B muestran los compuestos representativos de Fórmula 1 **101** y **103** capaces de promover la reducción de los niveles de p110 $\alpha$  selectivamente en células tumorales con PI3K mutante (HCC1954, PI3K $\alpha$  con mutación H1047R) frente a PI3K $\alpha$  natural (HDQ-P1, PI3K $\alpha$  natural) de manera

dependiente de la concentración. La Figura 3A muestra datos de inmunoelectrotransferencia que representan los niveles de p110 $\alpha$  (p110a, p110 alfa) después de un tratamiento de 24 horas con el Compuesto **101**, el Compuesto **103** y el Compuesto 436 del documento US 8242104 en células HCC-1954 (PI3K $\alpha$  con mutación H1047R). La Figura 3B muestra datos de inmunoelectrotransferencia que representan los niveles de p110 $\alpha$  (p110a, p110 alfa) después de un tratamiento de 24 horas con el Compuesto **101**, el Compuesto **103** y el Compuesto 436 del documento US 8242104 en células HDQ-P1 (PI3K $\alpha$  natural). Los compuestos **101** y **103** influyen más fuertemente en los niveles de p110 $\alpha$  en comparación con el compuesto 436 (documento US 8242104).

DOSIFICACIÓN ORAL DURANTE MÚLTIPLES DÍAS EN PERROS

La capacidad de un compuesto de la invención de promover la inflamación gastrointestinal y/o sistémica o de causar disminución linfática se evaluó mediante evaluación de patología clínica y anatómica después de la administración durante múltiples días en perros Beagle (7-14 días). Los compuestos de Fórmula 1 **101** y **103** a múltiplos de exposición libre >5 veces superiores a ICT<sub>60</sub> (inhibición del crecimiento tumoral del 60 % en un estudio de xenoinjerto con PI3K mutante) no promueven una firma proinflamatoria según lo determinado por la evaluación de patología clínica o patología anatómica (Tabla 11a y 11b). De forma similar, los compuestos **101** y **103** producen solo cantidades menores de disminución linfática a elevados múltiplos de exposición. Por el contrario, los experimentos con el compuesto de comparación taselisib indican efectos proinflamatorios significativos y disminución linfática a una exposición libre <0,3 veces superior al ICT<sub>60</sub> (Tabla 11c). Los compuestos de comparación alpelisib (BYL-719) y compuesto 436 (documento US 8242104) también causan inflamación y disminución linfática a múltiplos de exposición menores en comparación con los compuestos de Fórmula 1 **101** y **103** (Tabla 11d y 11e). El alcance y la gravedad de los hallazgos son consecuentes con el incremento de la inhibición de PI3K $\delta$  (delta) a múltiplos de exposición sobre CI<sub>50</sub> de CD69 para los compuestos de comparación.

Tabla 11. Dosificación durante múltiples días de compuestos de Fórmula I y compuestos de comparación en perros.

(a)

Compuesto <b>101</b> Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a CI <sub>50</sub> de CD69** (total, C <sub>mín.</sub> )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D14 (μM h, total/libre)	C <sub>máx.</sub> D14 (μM, total/libre)	C <sub>mín.</sub> D14 (μM, total)					
0,05	0,23/0,16	0,033/0,023	0,0046	0,2x/0,6x	0,07x	-	-	-
0,15	0,87/0,60	0,097/0,067	0,012	0,8x/2,3x	0,2x	-	-	-
0,5	2,0/1,38	0,31/0,21	0,017	1,9x/5,3x	0,3x	-	-	-

F<sub>u</sub> perro = 0,692; F<sub>u</sub> ratón = 0,252 (F<sub>u</sub> = fracción no unida en plasma de la especie)

\* Múltiplos de exposición usando ICT<sub>60</sub> de un estudio de 21 días de xenoinjerto KPL4; ICT<sub>60</sub> a 2 mg/kg, 1,04 μM h (total), 0,26 μM h (libre)

\*\* CI<sub>50</sub> de expresión de CD69 estimulada por a-IgM (sangre completa) = 67 nM

+ Hallazgos relacionados con la inflamación y los órganos linfáticos

(b)

Compuesto <b>103</b> Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a CI <sub>50</sub> de CD69** (total, C <sub>mín.</sub> )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D14 (μM h, total/libre)	C <sub>máx.</sub> D14 (μM, total/libre)	C <sub>mín.</sub> D14 (μM, total)					
0,1	0,27/0,14	0,04/0,02	0,0048	0,2x/4,7x	0,03x	-	-	-
0,3	0,9/0,46	0,13/0,066	0,011	0,8x/15x	0,08x	-	-	-
1	2,54/1,29	0,31/0,16	0,034	2,2x/43x	0,2x	Heces anómalas (blandas/mucosas, 4/4)	↓ linfocitos	Disminución linfática: timo

ES 2 764 497 T3

F<sub>u</sub> perro = 0,507; F<sub>u</sub> ratón = 0,03 (F<sub>u</sub> = fracción no unida en plasma de la especie)

5 \* Múltiplos de exposición usando ICT<sub>60</sub> de un estudio de ICT de 21 días en HCC1954; ICT<sub>60</sub> a 3 mg/kg, 1,13 µM h (total), 0,03 µM h (libre)

\*\* CI<sub>50</sub> de expresión de CD69 estimulada por a-IgM (sangre completa) = 142 nM

+ Hallazgos relacionados con la inflamación y los órganos linfáticos

10

(c)

taselisib Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a CI <sub>50</sub> de CD69 (total, C <sub>mín.</sub> )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D7 (µM h, total/libre)	C <sub>máx.</sub> D7 (µM, total/libre)	C <sub>mín.</sub> D7 (µM, total)					
0,3	0,44/0,12	0,07/0,02	0,002	0,1x/0,3x	0,7x	-	-	<p><u>Disminución linfática:</u> ganglios linfáticos, TLAI, bazo, timo</p> <p><u>Inflamación gastrointestinal:</u> Estómago, inflamación neutrofílica</p>
1	1,6/0,45	0,18/0,05	0,019	0,4x/1,0x	6,2x	-	-	<p><u>Disminución linfática:</u> ganglios linfáticos, TLAI, bazo, timo</p> <p><u>Inflamación gastrointestinal:</u> Áreas de color rojo oscuro en el estómago y el recto que corresponden a inflamación en estómago</p>

ES 2 764 497 T3

taselisib Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a $Cl_{50}$ de CD69 (total, $C_{mín.}$ )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D7 ( $\mu$ M h, total/libre)	$C_{máx.}$ D7 ( $\mu$ M, total/libre)	$C_{mín.}$ D7 ( $\mu$ M, total)					
3	5,1/1,4	1,09/0,31	0,016	1,2x/3,2x	5,2x	Pérdida de peso corporal (7,9 % frente a preestudios; principalmente 1 perro), orejas finas al tacto; heces anómalas; vómitos	↓ linfocitos ↑ neutrófilos ↑ monocitos ↑ globulinas ↓ proporción A:G ↑ fibrinógeno	<u>Disminución linfática:</u> ganglios linfáticos, TLAI, bazo, timo <u>Inflamación gastrointestinal:</u> Áreas de color rojo oscuro en el estómago y el recto que corresponden a inflamación en estómago, recto y ciego <u>Inflamación sistémica:</u> Infiltrados neutrofilicos en ganglios linfáticos, bazo, timo, hígado, pulmón, riñón

$F_u$  perro = 0,28;  $F_u$  ratón = 0,10 ( $F_u$  = fracción no unida en plasma de la especie)

5 \* Múltiplos de exposición usando  $ICT_{60}$  de un estudio de 21 días de xenoinjerto KPL4;  $ICT_{60}$  a 4,3  $\mu$ M h (total) o 0,44  $\mu$ M h (libre)

\*\*  $Cl_{50}$  de expresión de CD69 estimulada por  $\alpha$ -IgM (sangre completa) = 3,1 nM

10 + Hallazgos relacionados con la inflamación y los órganos linfáticos

(d)

Compuesto 436 (doc. US8242104) Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a $Cl_{50}$ de CD69** (total, $C_{mín.}$ )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D7 ( $\mu$ M h, total/libre)	$C_{máx.}$ D7 ( $\mu$ M, total/libre)	$C_{mín.}$ D7 ( $\mu$ M, total)					
0,5	3,4/2,3	0,68/0,46	0,016	1,2x/2,3x	0,4x	-	-	<u>Disminución linfática:</u> timo, ganglios linfáticos
2	15/10,2	2,5/1,7	0,059	5,4x/10,2x	1,3x	-	↑ fibrinógeno ↑ globulinas	<u>Disminución linfática:</u> timo, ganglios linfáticos, bazo, TLAI

Compuesto 436 (doc. US824210 4) Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a CI <sub>50</sub> de CD69** (total, C <sub>mín.</sub> )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D7 (µM h, total/libre)	C <sub>máx.</sub> D7 (µM, total/libre)	C <sub>mín.</sub> D7 (µM, total)					
6	56/38	6,8/4,6	0,408	20x/38x	9,1x	Pérdida de peso corporal (10 % frente a preestudi o)  hipoactivi dad, salivación excesiva, increment o del vómito y heces anómalas	↓ linfocitos  ↑ neutrófilos  ↑ fibrinógeno  ↑ globulinas	<u>Disminución linfática:</u> timo, ganglios linfáticos, bazo, TLAI  <u>Inflamación gastrointestinal:</u> esófago, estómago, colon, ciego  <u>Inflamación sistémica:</u> corazón, aorta, meninges

F<sub>u</sub> perro = 0,68; F<sub>u</sub> ratón = 0,36 (F<sub>u</sub> = fracción no unida en plasma de la especie)

5 \* Múltiplos de exposición usando ICT<sub>60</sub> de un estudio de 21 días de xenoinjerto KPL4; ICT<sub>60</sub> a 2,8 µM h (total) o 1,0 µM h (libre)

\*\* CI<sub>50</sub> de expresión de CD69 estimulada por α-IgM (sangre completa) = 45 nM

+ Hallazgos relacionados con la inflamación y los órganos linfáticos

10

(e)

alpelisib (BYL- 719) Dosis (mg/kg/día QD)	Exposición			Múltiplos de exposición* (total/libre, ABC)	Múltiplos de exposición a CI <sub>50</sub> de CD69** (total, C <sub>mín.</sub> )	Signos clínicos	Patología clínica <sup>+</sup>	Histopatología <sup>+</sup>
	ABC <sub>0-24h</sub> , D7 (µM h, total/libre)	C <sub>máx.</sub> D7 (µM, total/libre)	C <sub>mín.</sub> D7 (µM, total)					
3	14/1,0	1,97/0,14	0,20	0,2x/0,2x	0,3x	-	-	-
10	31,7/2,3	3,58/0,26	0,62	0,4x/0,4x	1,0x	-	↑ fibrinógeno	<u>Inflamación gastrointestinal:</u> infiltrados neutrofilicos, intestino grueso
30	160/11,5	20,6/1,5	1,25	2,2x/2,0x	2,0x	↓ apetito, ~10 % ↓ peso corporal	↑ neutrófilos  ↑ monocitos  ↑ globulinas  ↑ fibrinógeno	<u>Disminución linfática:</u> timo, ganglios linfáticos, TLAI  <u>Inflamación gastrointestinal:</u> infiltrados neutrofilicos en intestino grueso y delgado; úlcera rectal

$F_u$  perro = 0,072;  $F_u$  ratón = 0,082 ( $F_u$  = fracción no unida en plasma de la especie)

\* Múltiplos de exposición usando  $ICT_{60}$  de un estudio de 21 días de xenoinjerto KPL4;  $ICT_{60}$  a 72  $\mu$ M h (total) o 5,9  $\mu$ M h (libre)

\*\*  $CI_{50}$  de expresión de CD69 estimulada por  $\alpha$ -IgM (sangre completa) = 613 nM

+ Hallazgos relacionados con la inflamación y los órganos linfáticos

## ADMINISTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I

Los compuestos de la invención se pueden administrar por cualquier vía apropiada para la afección que se va a tratar. Las vías adecuadas incluyen oral, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarterial, intradérmica, intratecal y epidural), transdérmica, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal. Para el tratamiento inmunosupresor local, los compuestos se pueden administrar por administración intralesional, incluyendo perfusión o de otro modo poniendo en contacto el injerto con el inhibidor antes del trasplante. Se apreciará que la vía preferente puede variar, por ejemplo, con la afección del receptor. Cuando el compuesto se administra por vía oral, se puede formular como una pastilla, cápsula, comprimido, etc. con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. Si el compuesto se administra por vía parenteral, se puede formular con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable y en una forma inyectable de dosificación unitaria, como se detalla a continuación.

Una dosis para tratar a pacientes humanos puede variar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1000 mg del compuesto de Fórmula I. Una dosis típica puede ser de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 300 mg del compuesto. Se puede administrar una dosis una vez al día (c.v.d), dos veces al día (d.v.d) o con mayor frecuencia, dependiendo de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, incluyendo la absorción, distribución, metabolismo y excreción del compuesto particular. Además, factores de toxicidad pueden influir en la dosificación y en la pauta de administración. Cuando se administra por vía oral, la pastilla, cápsula o comprimido se puede ingerir diariamente o con menos frecuencia durante un periodo de tiempo especificado. La pauta se puede repetir durante varios ciclos de tratamiento.

## PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO CON LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I

Los compuestos de Fórmula I de la presente invención son útiles para tratar a un paciente humano o animal que padece una enfermedad o trastorno que surge del crecimiento, función o comportamiento celular anómalo asociado con la PI3K, tal como cáncer, que, por tanto, se puede tratar mediante un procedimiento que comprende la administración al mismo de un compuesto de la presente invención como se define anteriormente. Un paciente humano o animal que padece cáncer también se puede tratar mediante un procedimiento que comprende la administración al mismo de un compuesto de la presente invención como se define anteriormente. De este modo, la afección del paciente se puede mejorar.

Los procedimientos de la invención también incluyen tratar un cáncer seleccionado de mama, ovario, cuello del útero, próstata, testículos, aparato genitourinario, esófago, laringe, glioblastoma, neuroblastoma, estómago, piel, queratoacantoma, pulmón, carcinoma epidermoide, carcinoma de células grandes, carcinoma de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma microcítico, adenocarcinoma de pulmón, hueso, colon, adenoma, páncreas, adenocarcinoma, tiroides, carcinoma folicular, carcinoma no diferenciado, carcinoma papilar, seminoma, melanoma, sarcoma, carcinoma de vejiga, carcinoma de hígado y conductos biliares, carcinoma de riñón, pancreático, trastornos mieloides, linfoma, tricoleucocemia, cavidad bucal, nasofaríngeo, faringe, labio, lengua, boca, intestino delgado, colorrectal, intestino grueso, recto, cerebro y sistema nervioso central, leucemia hodgkiniana, bronquios, tiroides, hígado y conductillo biliar intrahepático, hepatocelular, gástrico, glioma/glioblastoma, endometrio, melanoma, riñón y pelvis renal, vejiga urinaria, cuerpo uterino, cuello uterino, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, leucemia linfocítica, leucemia linfocítica crónica (LCC), leucemia mielóide, cavidad oral y faringe, linfoma no hodgkiniano, melanoma y adenoma de colon veloso.

En base al análisis de expresión, el análisis inmunohistoquímico y el perfil de la línea celular, las neoplasias malignas de colon, mama, cuello uterino, estómago, pulmón y mieloma múltiple tienen más probabilidades de responder a los moduladores o inhibidores de PI3K.

La invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente.

La invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente.

La invención se refiere al compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para su uso para tratar el cáncer en un paciente.

La invención se refiere a un compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama y carcinoma de pulmón no microcítico.

5

La invención se refiere al uso de un compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama y carcinoma de pulmón no microcítico.

La invención se refiere al compuesto como se describió anteriormente en el presente documento para su uso para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama y carcinoma de pulmón no microcítico.

#### FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

15

Para usar un compuesto de la presente invención para el tratamiento terapéutico de mamíferos, incluyendo seres humanos, se formula normalmente de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar como una composición farmacéutica. De acuerdo con este aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención en asociación con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptables.

20

Una formulación típica se prepara mezclando un compuesto de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente. Los vehículos, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles en agua y/o hinchables, materiales hidrófilos o hidrófobos, gelatina, aceites, disolventes, agua y similares. El vehículo, diluyente o excipiente particular usado dependerá de los medios y el propósito para los que se aplica el compuesto de la presente invención. Los disolventes se seleccionan en general en base a disolventes reconocidos por expertos en la técnica como seguros (GRAS) para administrarse a un mamífero. En general, los disolventes seguros son disolventes acuosos no tóxicos, tales como agua y otros disolventes no tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Los disolventes acuosos adecuados incluyen agua, etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400, PEG 300), etc., y mezclas de los mismos. Las formulaciones también pueden incluir uno o más tampones, agentes estabilizantes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, antioxidantes, agentes opacificantes, fluidificantes, coadyuvantes tecnológicos, colorantes, edulcorantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto de la presente invención o composición farmacéutica del mismo) o para ayudar en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

25

30

35

Las formulaciones se pueden preparar usando procedimientos convencionales de disolución y mezclado. Por ejemplo, el principio activo (es decir, un compuesto de la presente divulgación o forma estabilizada del compuesto (por ejemplo, complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente de formación de complejos conocido)) se disuelve en un disolvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. El compuesto de la presente invención se formula típicamente en formas de dosificación farmacéuticas para proporcionar una dosificación fácilmente controlable del fármaco y para posibilitar el cumplimiento por parte del paciente de la pauta prescrita.

40

45

La composición (o formulación) farmacéutica para su aplicación se puede envasar en una variedad de modos dependiendo del procedimiento usado para administrar el fármaco. En general, un artículo para su distribución incluye un recipiente en el que se ha depositado la formulación farmacéutica en una forma apropiada. Los recipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como frascos (plástico y vidrio), sobres, ampollas, bolsas de plástico, cilindros de metal y similares. El recipiente también puede incluir un ensamblaje a prueba de manipulaciones para prevenir el acceso indiscreto al contenido del envase. Además, en el recipiente se ha depositado una ficha técnica que describe el contenido del recipiente. La ficha técnica también puede incluir advertencias apropiadas.

50

Las formulaciones farmacéuticas de los compuestos de la presente invención se pueden preparar para diversas vías y tipos de administración. Por ejemplo, un compuesto de Fórmula I que tiene el grado de pureza deseado se puede mezclar opcionalmente con diluyentes, vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed.), en forma de una formulación liofilizada, polvo molido o una solución acuosa. La formulación se puede llevar a cabo mezclando a temperatura ambiente, al pH apropiado y en el grado de pureza deseado con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que no sean tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. El pH de la formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero puede variar de aproximadamente 3 a aproximadamente 8. La formulación en un tampón acetato a pH 5 es un modo de realización adecuado.

60

65

El compuesto normalmente se puede almacenar como una composición sólida, una formulación liofilizada o como una solución acuosa.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se formularán, dosificarán y administrarán de una manera, es decir, en cantidades, concentraciones, pautas, ciclos, vehículos y vía de administración, consecuente con la buena práctica médica. Los factores que se deben tener en consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el procedimiento de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente eficaz" del compuesto que se va a administrar se regirá por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para mejorar o tratar el trastorno hiperproliferativo.

Como una propuesta general, la cantidad farmacéuticamente eficaz inicial del inhibidor administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 0,01-100 mg/kg, a saber, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, siendo el intervalo inicial típico del compuesto usado de 0,3 a 15 mg/kg/día.

Los diluyentes, vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametionio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los ingredientes farmacéuticos activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida de los compuestos de Fórmula I. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen un compuesto de Fórmula I, estando las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico), polilactidas (documento US 3773919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones incluyen las adecuadas para las vías de administración detalladas en el presente documento. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en una forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Las técnicas y formulaciones se encuentran en general en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co., Easton, PA). Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociar el ingrediente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme y estrechamente el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y, a continuación, si fuera necesario, conformando el producto.

Las formulaciones de un compuesto de Fórmula I adecuadas para administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como pastillas, cápsulas, sellos o comprimidos, cada una de las cuales contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de Fórmula I. Los comprimidos se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del ingrediente activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos se pueden recubrir o ranurar opcionalmente y se formulan opcionalmente para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo a partir de los mismos. Los comprimidos, pastilla para chupar, pastillas, suspensiones acuosas o en aceite, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, por ejemplo, cápsulas de gelatina, jarabes o elixires se pueden preparar para su uso oral. Las formulaciones de los compuestos de Fórmula I destinadas a uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier procedimiento conocido en la técnica para la

fabricación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes, incluyendo agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes conservantes, para proporcionar una preparación de sabor agradable. Los comprimidos que contienen el ingrediente activo en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico que son adecuados para la fabricación de comprimidos son aceptables. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio o de sodio, lactosa, fosfato de calcio o de sodio; agentes de granulación y disgregación, tales como almidón de maíz o ácido algínico; agentes aglutinantes, tales como almidón, gelatina o goma arábiga; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden estar no recubiertos o se pueden recubrir mediante técnicas conocidas, incluyendo microencapsulación para retardar la disgregación y la adsorción en el tubo gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción mantenida durante un periodo más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

Para el tratamiento del ojo u otros tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las formulaciones se aplican preferentemente como una pomada o crema tópica que contiene el/los ingrediente(s) activo(s) en una cantidad de, por ejemplo, un 0,075 a un 20 % p/p. Cuando se formulan en una pomada, los ingredientes activos se pueden emplear con una base de pomada parafínica o bien miscible en agua. De forma alternativa, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite en agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir un polialcohol, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilo, tales como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que potencie la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Los ejemplos de dichos potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados. La fase oleosa de las emulsiones de la presente invención se puede constituir a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender meramente un emulsionante, deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con tanto una grasa como un aceite. Preferentemente, se incluye un emulsionante hidrófilo conjuntamente con un emulsionante lipófilo que actúa como un estabilizador. También es preferente incluir tanto un aceite como una grasa. Conjuntamente, el/los emulsionante(s) con o sin estabilizante(s) constituye(n) la llamada cera emulsionante, y la cera conjuntamente con el aceite y la grasa constituye la llamada base de pomada emulsionante que forma la fase dispersada oleosa de las formulaciones de las cremas. Los emulsionantes y estabilizantes de emulsión adecuados para su uso en la formulación de la invención incluyen Tween® 60, Span® 80, alcohol cetosteárico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

Las suspensiones acuosas de los compuestos de Fórmula I contienen los materiales activos en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga, y agentes dispersantes o humectantes, tales como un fosfoglicérido natural, (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhidrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de sorbitán polioxietileno). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes, tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las composiciones farmacéuticas de los compuestos de Fórmula I pueden estar en forma de una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando dichos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxicos parenteralmente aceptables, tal como una solución en 1,3-butanodiol o preparada como un polvo liofilizado. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijados estériles se pueden emplear convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijado insípido, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, se pueden usar de forma similar ácidos grasos, tales como ácido oleico, en la preparación de inyectables.

La cantidad del ingrediente activo que se puede combinar con el material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado y del modo de administración particular. Por ejemplo, una formulación de liberación prolongada destinada a administración oral a seres humanos puede contener de aproximadamente 1 a 1000 mg de material activo formulado con una cantidad apropiada y conveniente de material de vehículo que puede variar de aproximadamente un 5 a aproximadamente un 95 % de las composiciones totales (peso/peso). La composición farmacéutica se puede preparar para proporcionar cantidades fácilmente medibles para su administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada a infusión intravenosa

puede contener de aproximadamente 3 a 500 µg del ingrediente activo por mililitro de solución para que se pueda producir la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de aproximadamente 30 ml/h.

5 Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor al que va destinada; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes.

10 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en el ojo también incluyen colirios en los que el ingrediente activo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. En dichas formulaciones, el ingrediente activo está presente preferentemente en una concentración de aproximadamente un 0,5 a un 20 % p/p, por ejemplo, de aproximadamente un 0,5 a un 10 % p/p, por ejemplo, de aproximadamente un 1,5 % p/p.

15 Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el ingrediente activo en una base saborizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga; y colutorios que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

20 Las formulaciones para administración rectal se pueden presentar como un supositorio con una base adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato.

25 Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 500 micrómetros (incluyendo los tamaños de partícula en un intervalo entre 0,1 y 500 micrómetros en incrementos de micrómetros, tal como 0,5, 1, 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.), que se administra por inhalación rápida a través de las fosas nasales o por inhalación a través de la boca para alcanzar los sacos alveolares. Las formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para administración en aerosol o polvo seco se pueden preparar de acuerdo con procedimientos convencionales y se pueden administrar con otros agentes terapéuticos, tales como los compuestos usados hasta ahora en el tratamiento o profilaxis de trastornos como se describe a continuación.

30 Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones para pulverización que contienen, además del ingrediente activo, dichos vehículos, que se conocen en la técnica como apropiados.

35 Las formulaciones se pueden envasar en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que solo requiera la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, para su inyección inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase descrita previamente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferentes son aquellas que contienen una dosis diaria o subdosis diaria unitaria, como se cita anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

40 Por lo tanto, la invención proporciona además composiciones veterinarias que comprenden al menos un ingrediente activo como se define anteriormente conjuntamente con un vehículo veterinario. Los vehículos veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos, que de otro modo son inertes o aceptables en la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, oral o por cualquier otra vía deseada.

50 **POLITERAPIA**

Los compuestos de Fórmula I se pueden emplear solos o en combinación con otros agentes terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno descrito en el presente documento, tal como inflamación o un trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, cáncer). En determinados modos de realización, un compuesto de Fórmula I se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o pauta posológica como politerapia, con un segundo compuesto terapéutico adicional que tiene propiedades antiinflamatorias o antihiperproliferativas o que es útil para tratar una inflamación, trastorno de la respuesta inmunitaria o trastorno hiperproliferativo (por ejemplo, cáncer). El agente terapéutico adicional puede ser un inhibidor de Bcl-2, un inhibidor de JAK, un agente antiinflamatorio, un agente inmunomodulador, agente quimioterápico, un potenciador de la apoptosis, un factor neurotrópico, un agente para tratar una cardiovascularopatía, un agente para tratar una hepatopatía, un agente antivírico, un agente para tratar trastornos sanguíneos, un agente para tratar la diabetes y un agente para tratar trastornos de inmunodeficiencia. El segundo agente terapéutico puede ser un agente antiinflamatorio AINE. El segundo agente terapéutico puede ser un agente quimioterápico. El segundo compuesto de la formulación de combinación farmacéutica o pauta posológica tiene preferentemente actividades complementarias al compuesto de Fórmula I de modo que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichos compuestos están presentes adecuadamente en

combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. En un modo de realización, una composición de la presente invención comprende un compuesto de Fórmula I, o un estereoisómero, tautómero, solvato, metabolito o sal o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, en combinación con un agente terapéutico, tal como un AINE.

5 La politerapia se puede administrar como una pauta simultánea o secuencial. Cuando se administra secuencialmente, la combinación se puede administrar en dos o más administraciones. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente existe un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos los) agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas.

Las dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son las usadas actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente recién identificado y otros agentes o tratamientos terapéuticos.

15 La politerapia puede proporcionar "sinergia" y demostrar ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los ingredientes activos usados conjuntamente es mayor que la suma de los efectos que resultan de usar los compuestos por separado. Se puede conseguir un efecto sinérgico cuando los ingredientes activos se: (1) coformulan y administran o suministran simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria combinada; (2) administran mediante alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se administra en un tratamiento de alternancia, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringuillas separadas, pastillas o cápsulas separadas, o infusiones separadas. En general, durante el tratamiento de alternancia, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de cada ingrediente activo, es decir, en serie, mientras que, en la politerapia, las dosificaciones eficaces de dos o más ingredientes activos se administran conjuntamente.

En un modo de realización particular del tratamiento, un compuesto de Fórmula I, o un estereoisómero, tautómero, solvato, metabolito o sal o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, se puede combinar con otros agentes terapéuticos, hormonales o de anticuerpos, tales como los descritos en el presente documento, así como combinar con tratamiento quirúrgico y radioterapia. Las politerapias de acuerdo con la presente invención comprenden, por tanto, la administración de al menos un compuesto de Fórmula I, o un estereoisómero, tautómero, solvato, metabolito o sal o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo, y el uso de al menos otro procedimiento de tratamiento del cáncer. Las cantidades del/de los compuesto(s) de Fórmula I y del/de los demás agente(s) terapéutico(s) farmacéuticamente activo(s) y los momentos de administración relativos se seleccionarán para lograr el efecto terapéutico combinado deseado.

Agentes terapéuticos adicionales empleados en combinación con un compuesto de Fórmula I incluyen 5-FU, docetaxel, eribulina, gemcitabina, cobimetinib, ipatasertib, paclitaxel, tamoxifeno, fulvestrant, GDC-0810, dexametasona, palbociclib, bevacizumab, pertuzumab, trastuzumab emtansina, trastuzumab y letrozol.

40 ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

En otro modo de realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación, o "kit", que contiene materiales útiles para el tratamiento de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente. En un modo de realización, el kit comprende un recipiente que comprende un compuesto de Fórmula I, o un estereoisómero, tautómero, solvato, metabolito o sal o profármaco farmacéuticamente aceptables del mismo. El kit puede comprender además una ficha técnica o un prospecto del envase en o asociado con el recipiente. El término "prospecto del envase" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias en relación con el uso de dichos productos terapéuticos. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, envases alveolados, etc. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente puede contener un compuesto de Fórmula I o una formulación del mismo que sea eficaz para tratar la afección y pueda tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un compuesto de Fórmula I. La ficha técnica o el prospecto del envase indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como el cáncer. Además, la ficha técnica o prospecto del envase pueden indicar que el paciente que se va a tratar tiene un trastorno, tal como un trastorno hiperproliferativo, neurodegeneración, hipertrofia cardíaca, dolor, jaquecas o una enfermedad o acontecimiento neurotraumático. En un modo de realización, la ficha técnica o los prospectos del envase indican que la composición que comprende un compuesto de Fórmula I se puede usar para tratar un trastorno que resulta de un crecimiento celular anómalo. La ficha técnica o prospecto del envase también pueden indicar que la composición se puede usar para tratar otros trastornos. De forma alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWF), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes,

filtros, agujas y jeringuillas.

El kit puede comprender además instrucciones para la administración del compuesto de Fórmula I y, si está presente, la segunda formulación farmacéutica. Por ejemplo, si el kit comprende una primera composición que comprende un compuesto de Fórmula I y una segunda formulación farmacéutica, el kit puede comprender además instrucciones para la administración simultánea, secuencial o separada de la primera y segunda composiciones farmacéuticas a un paciente que lo necesite.

En otro modo de realización, los kits son adecuados para la administración de formas orales sólidas de un compuesto de Fórmula I, tales como comprimidos o cápsulas. Dicho kit incluye preferentemente varias dosificaciones unitarias. Dichos kits pueden incluir una tarjeta que tiene las dosificaciones orientadas en orden de su uso previsto. Un ejemplo de dicho kit es un "envase alveolado". Los envases alveolados son bien conocidos en la industria del envasado y se usan ampliamente para envasar formas farmacéuticas de dosificación unitaria. Si se desea, se puede proporcionar una ayuda de recuerdo, por ejemplo, en forma de números, letras u otras marcas o con un encarte de calendario, que designe los días de la pauta de tratamiento en los que se pueden administrar las dosificaciones.

De acuerdo con un modo de realización, un kit puede comprender (a) un primer recipiente con un compuesto de Fórmula I contenido en el mismo; y opcionalmente (b) un segundo recipiente con una segunda formulación farmacéutica contenida en el mismo, en el que la segunda formulación farmacéutica comprende un segundo compuesto con actividad antihiperproliferativa. De forma alternativa, o adicionalmente, el kit puede comprender además un tercer recipiente que comprenda un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyectables (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

En determinados otros modos de realización en los que el kit comprende una composición de Fórmula I y un segundo agente terapéutico, el kit puede comprender un recipiente para contener las composiciones separadas, tal como un frasco dividido o un envase de lámina metálica dividido; sin embargo, las composiciones separadas también se pueden contener en un único recipiente no dividido. Típicamente, el kit comprende instrucciones para la administración de los componentes separados. La forma del kit es en particular ventajosa cuando los componentes separados se administran preferentemente en diferentes formas farmacéuticas (por ejemplo, oral y parenteral), se administran en diferentes intervalos de dosificación o cuando el médico prescriptor desea la valoración de los componentes individuales de la combinación.

#### PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE FÓRMULA I

Los compuestos de Fórmula I se pueden sintetizar por vías sintéticas que incluyen procedimientos análogos a los bien conocidos en las técnicas químicas, en particular, en vista de la descripción contenida en el presente documento, y aquellas para otros heterociclos descritas en: *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, editores Katritzky y Rees, Elsevier, 1997, por ejemplo, volumen 3; *Liebigs Annalen der Chemie*, (9):1910-16, (1985); *Helvetica Chimica Acta*, 41:1052-60, (1958); *Arzneimittel-Forschung*, 40(12):1328-31, (1990), cada uno de los cuales se incorpora expresamente por referencia. Los materiales de partida están disponibles en general de fuentes comerciales, tales como Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI) o se preparan fácilmente usando procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, preparados mediante procedimientos descritos en general en Louis F. Fieser y Mary Fieser, *Reagents for Organic Synthesis*, v. 1-23, Wiley, N.Y. (1967-2006 ed.), o *Beilsteins Handbuch der organischen Chemie*, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlín, incluyendo los suplementos (también disponibles por medio de la base de datos en línea de Beilstein).

Las transformaciones de química sintética y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles en la síntesis de los compuestos de Fórmula I y los reactivos e intermedios necesarios son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los descritos en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3.<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons (1999); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons (1995) y ediciones posteriores de los mismos.

Los Ejemplos proporcionan procedimientos ejemplares para preparar los compuestos de Fórmula I. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden usar otras vías sintéticas para sintetizar los compuestos de Fórmula I. Aunque los materiales de partida y reactivos específicos se representan y analizan en las Figuras y Ejemplos, otros materiales de partida y reactivos se pueden sustituir fácilmente para proporcionar una variedad de derivados y/o condiciones de reacción. Además, muchos de los compuestos ejemplares preparados mediante los procedimientos descritos se pueden modificar adicionalmente en vista de esta divulgación usando una química convencional bien conocida por los expertos en la técnica.

En la preparación de los compuestos de la Fórmulas I puede ser necesaria la protección de la funcionalidad remota (por ejemplo, amina primaria o secundaria) de los intermedios. La necesidad de dicha protección variará

dependiendo de la naturaleza de la funcionalidad remota y las condiciones de los procedimientos de preparación. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen acetilo, trifluoroacetilo, t-butoxicarbonilo (BOC), benciloxicarbonilo (CBz) y 9-fluorenilmetileno-x-carbonilo (Fmoc). La necesidad de dicha protección es determinada fácilmente por un experto en la técnica. Para una descripción general de los grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

En los procedimientos de preparación de los compuestos de Fórmula I puede ser ventajoso separar los productos de reacción entre sí y/o de los materiales de partida. Los productos deseados de cada etapa o serie de etapas se separan y/o purifican al grado de homogeneidad deseado mediante técnicas comunes en la técnica. Típicamente, dichas separaciones implican extracción en múltiples fases, cristalización en un disolvente o mezcla de disolventes, destilación, sublimación o cromatografía. La cromatografía puede implicar cualquier número de procedimientos que incluyan, por ejemplo: procedimientos y aparatos de cromatografía de fase inversa y de fase normal; de exclusión por tamaño; de intercambio iónico; de líquidos de alta, media y baja presión; cromatografía analítica a pequeña escala; de lecho móvil simulado (SMB) y en capa fina o gruesa preparativa, así como técnicas de cromatografía en capa fina a pequeña escala y ultrarrápida.

Otra clase de procedimientos de separación implica el tratamiento de una mezcla con un reactivo seleccionado para unirse a o de otro modo hacer separable un producto deseado, material de partida sin reaccionar, subproducto de reacción o similares. Dichos reactivos incluyen adsorbentes o absorbentes, tales como carbón activado, tamices moleculares, medios de intercambio iónico o similares. De forma alternativa, los reactivos pueden ser ácidos en el caso de un material básico, bases en el caso de un material ácido, reactivos de unión tales como anticuerpos, proteínas de unión, quelantes selectivos tales como éteres de corona, reactivos de extracción iónica líquido/líquido (LIX) o similares. La selección de los procedimientos de separación apropiados depende de la naturaleza de los materiales implicados, tal como el punto de ebullición y el peso molecular en la destilación y sublimación, la presencia o ausencia de grupos funcionales polares en la cromatografía, la estabilidad de los materiales en medios ácidos y básicos en la extracción en múltiples fases y similares.

Las mezclas diaestereoméricas se pueden separar en sus diastereómeros individuales en base a sus diferencias fisicoquímicas mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada. Los enantiómeros se pueden separar convirtiendo la mezcla enantiomérica en una mezcla diaestereomérica mediante reacción con un compuesto ópticamente activo apropiado (por ejemplo, un auxiliar quiral tal como un alcohol quiral o cloruro de ácido de Mosher), separando los diastereómeros y convirtiendo (por ejemplo, hidrolizando) los diastereómeros individuales en los enantiómeros puros correspondientes. Además, algunos de los compuestos de la presente invención pueden ser atropoisómeros (por ejemplo, biarilos sustituidos) y se consideran parte de la presente invención. Los enantiómeros también se pueden separar mediante el uso de una columna de HPLC quiral.

Se puede obtener un único estereoisómero, por ejemplo, un enantiómero, sustancialmente libre de su estereoisómero mediante resolución de la mezcla racémica usando un procedimiento tal como la formación de diastereómeros usando agentes de resolución ópticamente activos (Eliel, E. y Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds," John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994; Lochmuller, C. H., (1975) *J. Chromatogr.*, 113(3):283-302). Las mezclas racémicas de compuestos quirales de la invención se pueden separar y aislar mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo: (1) la formación de sales diastereoméricas iónicas con compuestos quirales y la separación mediante cristalización fraccionada u otros procedimientos, (2) la formación de compuestos diastereoméricos con reactivos de derivatización quirales, la separación de los diastereoisómeros y la conversión en los estereoisómeros puros y (3) la separación de los estereoisómeros sustancialmente puros o enriquecidos directamente en condiciones quirales. Véase: "Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology," Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York (1993).

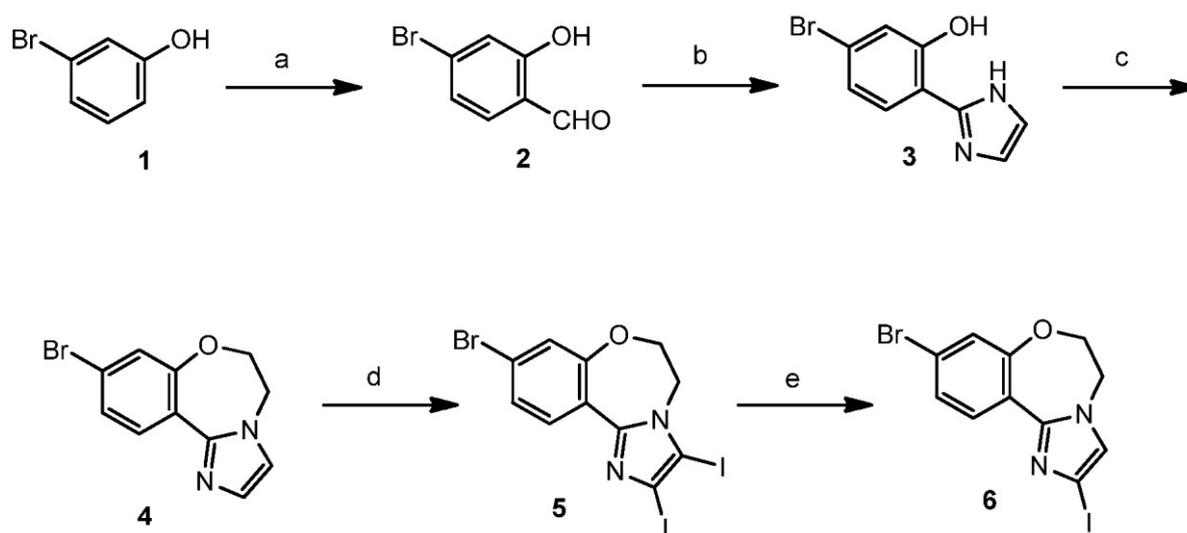
En el procedimiento (1) se pueden formar sales diastereoméricas mediante reacción de bases quirales enantioméricamente puras, tales como brucina, quinina, efedrina, estricnina,  $\alpha$ -metil- $\beta$ -feniletilamina (anfetamina) y similares, con compuestos asimétricos que tienen funcionalidad ácida, tales como ácido carboxílico y ácido sulfónico. Se pueden inducir las sales diastereoméricas para la separación mediante cristalización fraccionada o cromatografía iónica. Para la separación de los isómeros ópticos de compuestos amino, la adición de ácidos carboxílicos o sulfónicos quirales, tales como ácido alcanforsulfónico, ácido tartárico, ácido mandélico o ácido láctico, puede dar como resultado la formación de las sales diastereoméricas.

De forma alternativa, mediante el procedimiento (2) se hace reaccionar el sustrato que se va a separar con un enantiómero de un compuesto quiral para formar un par diastereomérico (E. y Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., 1994, p. 322). Los compuestos diastereoméricos se pueden formar haciendo reaccionar compuestos asimétricos con reactivos de derivatización quirales enantioméricamente puros, tales como derivados de mentilo, seguido de separación de los diastereoisómeros e hidrólisis para proporcionar el enantiómero puro o enriquecido. Un procedimiento de determinación de la pureza óptica implica preparar ésteres quirales, tales como un éster de mentilo, por ejemplo, cloroformiato de (-)-mentilo en presencia de una base, o éster de Mosher, acetato de  $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilo (Jacob III. *J. Org. Chem.* (1982) 47:4165), de la mezcla racémica, y analizar el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para determinar la presencia de los dos enantiómeros o

diastereómeros atropoisoméricos. Los diastereómeros estables de los compuestos atropoisoméricos se pueden separar y aislar mediante cromatografía de fase normal e inversa siguiendo los procedimientos para la separación de las naftilisoquinolinas atropoisoméricas (documento WO 96/15111). Mediante el procedimiento (3) se puede separar una mezcla racémica de dos enantiómeros mediante cromatografía usando una fase estacionaria quiral ("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W. J. Lough, Ed., Chapman y Hall, Nueva York; Okamoto, J. Chromatogr., (1990) 513:375-378). Se pueden distinguir los enantiómeros enriquecidos o purificados mediante procedimientos usados para distinguir otras moléculas quirales con átomos de carbono asimétrico, tales como la rotación óptica y el dicroísmo circular.

10 Los compuestos de la invención se prepararon como se ilustra en los Esquemas generales 1 y 2.

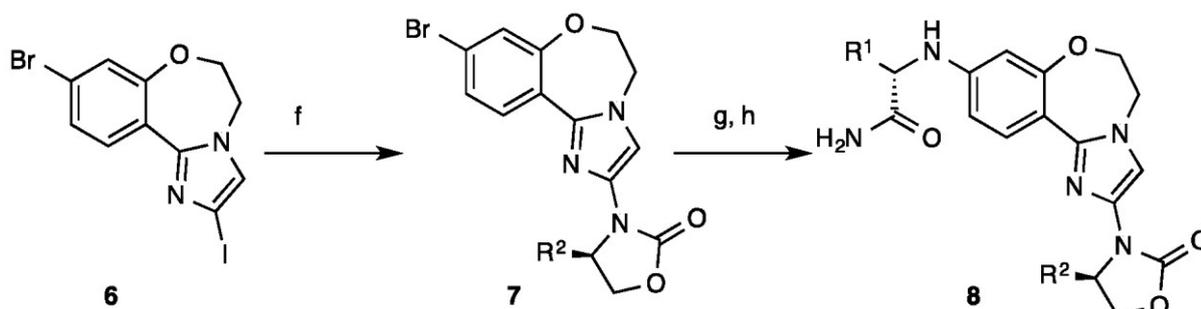
Esquema 1.



15 a)  $MgCl_2$ , trietilamina, paraformaldehído, acetonitrilo, calor; b) oxalaldehído, hidróxido de amonio, calor; c) carbonato de cesio, 1,2-dibromoetano, DMF, calor; d) N-yodosuccinimida, DMF, calor; e) i.  $EtMgBr$ , THF,  $-20\text{ }^\circ C$ , ii. cloruro de amonio acuoso

20 Como se muestra en el Esquema 1, se puede obtener 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído **2** formilando el 3-bromofenol disponible comercialmente. El calentamiento de **2** con oxalaldehído e hidróxido de amonio da lugar a **3**. El anillo de oxazepina se puede formar calentando **3** con 1,2-dibromoetano. La bis-yodación se puede inducir por reacción con N-yodosuccinimida, y el grupo 3-yodo se elimina selectivamente mediante tratamiento con bromuro de etilmagnesio a temperatura reducida, para dar **6**.

25 Esquema 2.



30 f) oxazolidin-2-ona 4-sustituida,  $Cu(OAc)_2$ , *trans*-N,N-dimetilciclohexano-1,2-diamina, carbonato de potasio, dioxano, calor; g)  $HN(R^2)CH(R^1)CO_2H$ ,  $CuI$ ,  $K_3PO_4$ , DMSO, calor; h) cloruro de amonio, trietilamina, HATU (hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio)

35 Como se muestra en el Esquema 2, **6** se puede acoplar a una oxazolidin-2-ona apropiadamente sustituida usando catálisis con cobre para proporcionar **7**. El intermedio bromado **7** se puede acoplar a aminoácidos apropiadamente sustituidos bajo catálisis con cobre, seguido de un acoplamiento de amida mediado por HATU con cloruro de amonio para proporcionar los compuestos **8**.

## EJEMPLOS

Abreviaturas

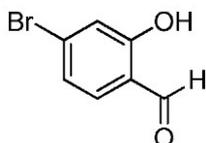
5	DMSO	Dimetilsulfóxido
	IEN	Ionización por electronebulización
10	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta presión
	CLEM	Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
	min	Minutos
15	N	Normal
	RMN	Resonancia magnética nuclear
20	R <sub>T</sub>	Tiempo de retención

Procedimiento A de CLEM: Los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas con cuadrupolo Waters Micromass ZQ2000 conectado a un sistema Waters Acquity UPLC con un detector PDA UV. El espectrómetro tiene una fuente de electronebulización que funciona en modo de ion positivo y negativo. Este sistema usa una columna Acquity BEH C18 de 1,7 µm de 100 x 2,1 mm mantenida a 40 °C o una columna Acquity BEH Shield RP18 de 1,7 µm de 100 x 2,1 mm mantenida a 40 °C y un caudal de 0,4 ml/minuto. El sistema de disolvente inicial era un 95 % de agua que contenía ácido fórmico al 0,1 % (disolvente A) y un 5 % de acetonitrilo que contenía ácido fórmico al 0,1 % (disolvente B) durante los primeros 0,4 minutos, seguido de un gradiente de hasta un 5 % de disolvente A y un 95 % de disolvente B durante los siguientes 5,6 minutos. Esto se mantuvo durante 0,8 minutos antes de volver a un 95 % de disolvente A y un 5 % de disolvente B durante los siguientes 0,2 minutos. El tiempo de desarrollo total fue de 8 minutos.

Procedimiento B de CLEM: Los experimentos se realizaron en un HPLC Agilent 1100 acoplado con un espectrómetro de masas Agilent MSD usando IEN como fuente de ionización. La separación por CL se realizó usando una columna Phenomenex XB-C18 de 1,7 µm, 50 x 2,1 mm con un caudal de 0,4 ml/minuto. El disolvente A era agua con 0,1 % de ácido fórmico, el disolvente B era acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico. El gradiente consistió en un 2 a 98 % de disolvente B durante 7 minutos y mantenimiento de un 97 % de B durante 1,5 minutos después del equilibrado durante 1,5 minutos. La temperatura de la columna de CL era de 40 °C. La absorbancia UV se midió a 220 nm y 254 nm y se aplicó un escaneo completo de todo el espectro de masas a todos los experimentos.

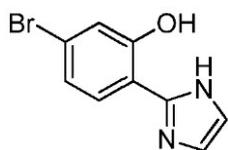
Ejemplo 101 (S)-2-((2-((S)-4-(Difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida **101**

45 Etapa 1: 4-Bromo-2-hidroxibenzaldehído



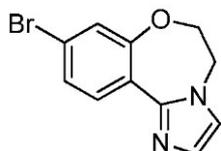
50 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 20 l purgado y mantenido en atmósfera inerte de nitrógeno se colocó 3-bromofenol (1300 g, 7,51 mol), dicloromagnesio (1078 g, 11,3 mol), trietilamina (3034 g, 30,0 mol) y acetonitrilo (7,8 l). La mezcla se agitó durante 30 minutos a 40 °C. A la mezcla se le añadió paraformaldehído (676 g, 22,6 mol) a 80 °C. La solución resultante se agitó durante 6 horas a 76 °C. Esta reacción se repitió 5 veces. Las mezclas de reacción combinadas se desactivaron mediante la adición de 12 l de cloruro de hidrógeno acuoso (4 N). El valor de pH de la solución se ajustó a 5 con cloruro de hidrógeno acuoso concentrado (12 N). La solución resultante se extrajo con 1 x 20 l de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se evaporaron al vacío. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (elución: acetato de etilo al 15 % en éter de petróleo) para dar un producto bruto que se lavó con 2,4 l de éter metil *terc*-butílico:hexano (1:4). Los sólidos resultantes se recogieron por filtración para dar 7,0 kg (78 %) del compuesto del título como un sólido amarillo.

60 Etapa 2: 5-Bromo-2-(1*H*-imidazol-2-il)fenol



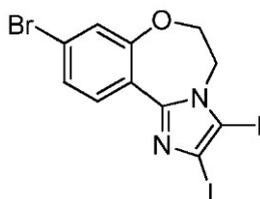
5 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 20 l se colocó una solución de 4-bromo-2-hidroxibenzaldehído (700 g, 3,50 mol) en metanol (7,0 l) y oxaldehído (40 %) (2540 g, 17,5 mol), seguido de la adición gota a gota durante 4 horas de amoniaco acuoso (25-28 %, 3500 g) con agitación y manteniendo la temperatura por debajo de 40 °C. La solución resultante se agitó durante 15 horas a 30-35 °C. Esta reacción se repitió 9 veces. Las 9 mezclas de reacción combinadas se evaporaron al vacío manteniendo la temperatura por debajo de 45 °C. El residuo se diluyó con 100 l de acetato de etilo con agitación durante 30 minutos. Los sólidos se filtraron y la solución resultante se diluyó con agua. La fase acuosa se extrajo con 35 l de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se evaporaron al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 5 a 75 % de acetato de etilo en éter de petróleo) para proporcionar 2,4 kg (29 %) del compuesto del título como un sólido amarillo.

15 Etapa 3: 9-Bromo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina



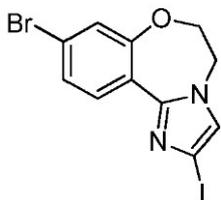
20 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 20 l se colocó una solución de 5-bromo-2-(1*H*-imidazol-2-il)fenol (1,4 kg, 5,86 mol) en *N,N*-dimetilformamida (14 l) y carbonato de cesio (7,2 kg, 22,1 mol). La mezcla se agitó durante 20 minutos. A la mezcla de reacción se le añadió 1,2-dibromoetano (4,1 kg, 21,8 mol). La solución resultante se agitó durante 4-12 horas a 85-90 °C, se enfrió a 15 °C y se filtró. La torta de filtrado se lavó con 3,0 l de acetato de etilo. El filtrado se diluyó con 14 l de acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (4 x 14 l), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar 1,1 kg (71 %) del compuesto del título como un sólido de color amarillo claro. CLEM (IEN): [M+H]<sup>+</sup> = 265; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,32 (d, *J* = 8,4, 1H), 7,35-7,24 (m, 3H), 7,06 (s, 1H), 4,47-4,42 (m, 4H).

25 Etapa 4: 9-Bromo-2,3-diiodo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina



30 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 20 l se colocó 9-bromo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina (2,5 kg, 9,43 mol) y *N,N*-dimetilformamida (12,5 l), seguido de la adición de *N*-yodosuccinimida (6,0 kg, 26,7 mol) en varios lotes con agitación. La solución resultante se agitó durante 12 horas a 60 °C, se enfrió a 15 °C con un baño de agua/hielo, se diluyó con 12,5 l de agua/hielo y se filtró. Los sólidos filtrados se recrystalizaron en éter de petróleo para proporcionar 4,0 kg (82 %) del compuesto del título como un sólido amarillo.

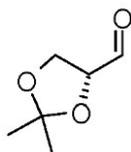
35 Etapa 5: 9-Bromo-2-yodo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina



40 En un matraz de fondo redondo de 4 bocas y 20 l purgado y mantenido en atmósfera inerte de nitrógeno se colocó 9-bromo-2,3-diiodo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina (800 g, 1,55 mol) y tetrahydrofurano (2,4 l), seguido de la adición gota a gota de bromuro de etilmagnesio (solución 1 N en éter, 1,7 l) con agitación a -20 °C

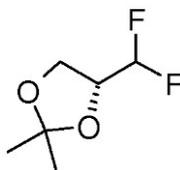
durante 3,5 horas. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas manteniendo la temperatura a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  usando un baño de hielo/sal. La mezcla resultante se desactivó mediante la adición de 3,0 l de cloruro de amonio acuoso saturado, y se extrajo con acetato de etilo ( $2 \times 8,0\text{ l}$ ). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera ( $2 \times 10\text{ l}$ ), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto se trituró con 8,0 l de acetato de etilo:éter de petróleo (1:5), se filtró y se lavó con éter de petróleo para proporcionar 501 g (83 %) del compuesto del título como un sólido marrón. CLEM (IEN):  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 391$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  8,22 (d,  $J = 8,7$ , 1H), 7,55 (s, 1H), 7,30-7,25 (m, 2H), 4,45-4,41 (m, 4H).

Etapa 6: (R)-2,2-Dimetil-[1,3]dioxolano-4-carbaldehído



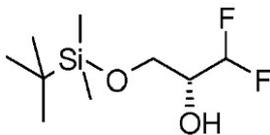
Se disolvió peryodato de sodio (57,0 g, 270 mmol) en agua caliente (115 ml) y se añadió sílice (200 g, 60 Å, 220-440 mesh, tamaño de partícula 35-75  $\mu\text{m}$ ). La mezcla se agitó vigorosamente hasta que se obtuvo un polvo que fluía libremente. Esto se añadió a una solución de 1,2:5,6-*bis*-O-(1-metiletiliden)-*D*-manitol (50 g, 190 mmol) en diclorometano (1,0 l) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla resultante se filtró a través de un lecho de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y los sólidos se lavaron a fondo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se evaporaron al vacío para proporcionar 37,2 g (75 %) del compuesto del título como un aceite incoloro. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,73 (d,  $J = 1,9$  Hz, 1H), 4,38 (ddd,  $J = 7,4$ , 4,7, 1,9 Hz, 1H), 4,18 (dd,  $J = 8,8$ , 7,4 Hz, 1H), 4,10 (dd,  $J = 8,8$ , 4,7 Hz, 1H), 1,49 (s, 3H), 1,43 (s, 3H).

Etapa 7: (R)-4-Difluorometil-2,2-dimetil-[1,3]dioxolano



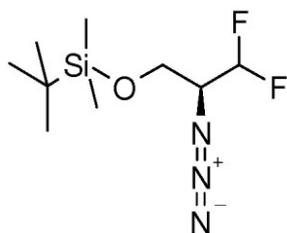
A una solución de (R)-2,2-dimetil-[1,3] dioxolano-4-carbaldehído (7,08 g, 54 mmol) en diclorometano (50 ml) enfriado en un baño de agua se añadió gota a gota trifluoruro de dietilaminoazufre (8,4 ml, 62,6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla resultante se añadió gota a gota a una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio, enfriada con hielo. La mezcla se extrajo adicionalmente con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar 6,58 g (79 %) del compuesto del título en bruto como un aceite naranja. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,69 (td,  $J = 55,8$ , 4,9 Hz, 1H), 4,27-4,17 (m, 1H), 4,16-4,03 (m, 2H), 1,46 (s, 3H), 1,38 (s, 3H).

Etapa 8: (R)-3-(*tert*-Butildimetilsilanilo)-1,1-difluoropropan-2-ol



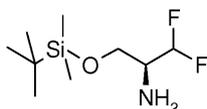
Se añadió HCl en dioxano (4 N, 10,8 ml, 43,2 mmol) a una solución de (R)-4-difluorometil-2,2-dimetil[1,3]dioxolano (6,58 g, 43,2 mmol) en metanol (40 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla resultante se evaporó al vacío y se formó un azeótropo con acetonitrilo. El residuo se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (10 ml) y se añadieron cloruro de *tert*-butildimetilsililo (6,53 g, 43,2 mmol), trietilamina (9,0 ml, 64,9 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (cant. catalítica). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla resultante se lavó con agua y, a continuación, se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 30 % de acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 3,43 g (35 %) del compuesto del título como un aceite amarillo. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,66 (td,  $J = 56,4$ , 4,6 Hz, 1H), 3,76-3,60 (m, 2H), 2,46 (d,  $J = 6,4$  Hz, 1H), 0,81 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Etapa 9: ((S)-2-Acido-3,3-difluoropropoxi)-*tert*-butildimetilsilano



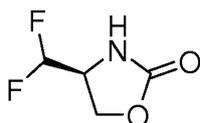
5 Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (2,9 ml, 17,4 mmol) gota a gota a una solución de (*R*)-3-(*tert*-butildimetilsilaniloxy)-1,1-difluoropropan-2-ol (3,43 g, 15,1 mmol) y piridina (2,0 ml, 24,2 mmol) en diclorometano (50 ml) a -20 °C y la mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 20 minutos y, a continuación, a 0 °C durante 1 hora. La mezcla resultante se diluyó con HCl acuoso 0,5 N y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio y evaporaron al vacío. El residuo bruto se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (10 ml), se añadió acida sódica (2,96 g, 45,5 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar 4,50 g del compuesto del título en bruto. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,74 (td, *J* = 55,4, 4,4 Hz, 1H), 3,81-3,71 (m, 2H), 3,58-3,47 (m, 1H), 0,81 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

15 Etapa 10: (*S*)-1-(*tert*-Butildimetilsilaniloximetil)-2,2-difluoroetilamina



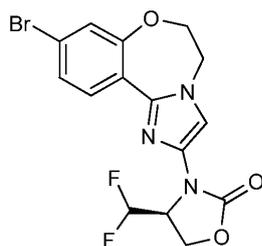
20 Se añadió hidróxido de paladio sobre carbono (200 mg, 20 %) a una solución de ((*R*)-2-acido-3,3-difluoropropoxi)-*tert*-butildimetilsilano (4,50 g, bruto, se asumen ~15,1 mmol) en acetato de etilo (20 ml) y metanol (2,0 ml) y la reacción se agitó bajo un globo de hidrógeno durante 16 horas. La reacción se filtró, se añadió hidróxido de paladio sobre carbono nuevo (400 mg, 20 %) y la mezcla de reacción se agitó bajo un globo de hidrógeno durante 16 horas. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar 3,08 g (90 %) del producto del título en bruto como un aceite incoloro. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,66 (td, *J* = 57,0, 4,7 Hz, 1H), 3,71-3,57 (m, 2H), 3,00-2,89 (m, 1H), 1,42 (s an., 2H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

25 Etapa 11: (*S*)-4-Difluorometiloxazolidin-2-ona



30 Se añadió HCl en dioxano (4 N, 5,0 ml, 20 mmol) a una solución de (*R*)-1-(*tert*-butildimetilsilaniloximetil)-2,2-difluoroetilamina (*Org. Lett.*, Vol. 9, n.º 1, 2007, 41-44) (2,30 g, 10,3 mmol) en metanol (5,0 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se evaporó al vacío y el aceite resultante se trituró con éter dietílico para dar un sólido que se secó al vacío. El sólido se disolvió en una mezcla de tolueno (20 ml) y KOH (2,50 g, 44,6 mmol en 20 ml de agua) a 0 °C. Se añadió fosgeno (16,3 ml, 20 % en tolueno) gota a gota, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora. La mezcla se evaporó al vacío, el residuo resultante se extrajo con alcoholes desnaturalizados industriales calientes y el sólido se recogió por filtración. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 100 % acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 830 mg (68 %) del compuesto del título como un sólido blanquecino, [α]<sub>D</sub> = +10,1 (c = 2,37, CHCl<sub>3</sub>). RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,96 (s an., 1H), 5,78 (td, *J* = 55,3, 4,8 Hz, 1H), 4,54 (t, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,42 (dd, *J* = 9,6, 4,4 Hz, 1H), 4,17-4,06 (m, 1H).

Etapa 12: (*S*)-3-(9-Bromo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(difluorometil)oxazolidin-2-ona



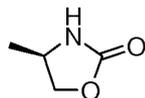
Una mezcla de 9-bromo-2-yodo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepina (250 mg, 0,64 mmol), (S)-4-difluorometiloxazolidin-2-ona (88 mg, 0,64 mmol), *trans*-*N,N'*-dimetil-1,2-ciclohexano diamina (36 mg, 0,26 mmol), yoduro cuproso (24 mg, 0,13 mmol) y carbonato de potasio (177 mg, 1,28 mmol) en dioxano (3,0 ml) se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 5 h y, a continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con amoníaco acuoso al 15 % y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo resultante se trituró con metanol y, a continuación, se purificó por HPLC preparativa [C18, acetonitrilo al 60 % (ácido fórmico al 0,1 %) en agua (ácido fórmico al 0,1 %), ciclo de 20 minutos] para proporcionar 20 mg (8 %) del compuesto del título como un sólido blanco. CLEM (IEN): [M+H]<sup>+</sup> = 400/402. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,19 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,29 (s, 1H), 7,24-7,19 (m, 2H), 6,65 (ddd, *J* = 57,8, 54,5, 1,0 Hz, 1H), 4,87 (ddd, *J* = 24,0, 9,2, 4,0 Hz, 1H), 4,73 (dd, *J* = 9,5, 4,2 Hz, 1H), 4,53 (t, *J* = 9,2 Hz, 1H), 4,48-4,43 (m, 2H), 4,38-4,33 (m, 2H).

Etapa 13: (S)-2-((2-((S)-4-(Difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida

Se suspendieron (S)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(difluorometil)oxazolidin-2-ona (600 mg, 1,50 mmol), *L*-alanina (267 mg, 3,00 mmol), yoduro cuproso (57 mg, 0,30 mmol) y fosfato de potasio tribásico (637 mg, 3,00 mmol) en dimetilsulfóxido (6,0 ml). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 2 horas. Tras dejar enfriar a temperatura ambiente, se añadieron dimetilsulfóxido (4,0 ml), cloruro de amonio (480 mg, 9,00 mmol) y trietilamina (3,1 ml, 22,5 mmol). A la suspensión agitada resultante se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (5,10 g, 13,5 mmol), en porciones durante 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y, a continuación, se filtró a través de Celite®, lavando con acetato de etilo. Los extractos orgánicos se lavaron con bicarbonato de sodio acuoso saturado y la fase acuosa se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 5 % de metanol en diclorometano) y, a continuación, por cromatografía de fluido supercrítico quiral para proporcionar 294 mg (46 %) de **101** como un sólido blanquecino. CLEM (IEN): R<sub>T</sub> (min) = 2,89, [M+H]<sup>+</sup> = 408, procedimiento = A; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,00 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,38 (s an., 1H), 7,18 (s, 1H), 7,00 (s an., 1H), 6,71 (t, *J* = 55,9 Hz, 1H), 6,41 (dd, *J* = 8,8, 2,3 Hz, 1H), 6,16 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,09 (d, *J* = 1,9 Hz, 1H), 5,02-4,89 (m, 1H), 4,63-4,52 (m, 2H), 4,39-4,30 (m, 4H), 3,76 (quint., *J* = 7,0 Hz, 1H), 1,30 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H).

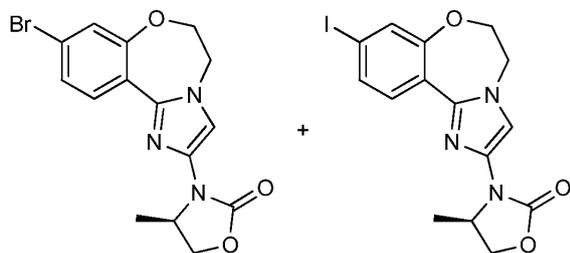
Ejemplo 102 (S)-2-Ciclobutil-2-((*R*)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida **102**

Etapa 1: (*R*)-4-Metiloxazolidin-2-ona



A una mezcla de *D*-alaninol (8,65 g, 0,12 mmol) en tolueno y KOH acuoso (124 ml, 12,5 % ac., 0,28 mmol) a 0 °C se añadió fosgeno (72,7 ml, 20 % en tolueno, 0,14 mmol) a tal velocidad que la temperatura interna permaneciera <5 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante otros 40 minutos y, a continuación, se evaporó a sequedad. El residuo bruto se extrajo con alcoholes desnaturalizados industriales, la suspensión se filtró y el filtrado se evaporó al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 40 a 100 % acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 10,4 g (90 %) del compuesto del título como un sólido blanco. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 6,00 (s an., 1H), 4,50 (t, *J* = 6,5 Hz, 1H), 4,07-3,97 (m, 1H), 3,95 (dd, *J* = 7,8, 6,2 Hz, 1H), 1,30 (d, *J* = 6,1 Hz, 3H).

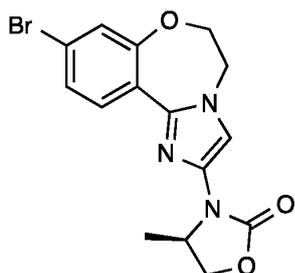
Etapa 2: (*R*)-3-(9-Bromo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-metiloxazolidin-2-ona y (*R*)-3-(9-Yodo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-metiloxazolidin-2-ona



5 Una mezcla de 9-bromo-2-yodo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepina (30,0 g, 76,7 mmol), (*R*)-4-metiloxazolidin-2-ona (7,70 g, 76,7 mmol), yoduro cuproso (1,61 g, 8,40 mmol), *trans*-*N,N'*-dimetil-1,2-ciclohexano diamina (2,7 ml, 16,9 mmol) y carbonato de potasio (14,9 g, 107 mmol) se suspendió en 1,4-dioxano (200 ml) y la mezcla de reacción se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla resultante se calentó a 100 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con solución acuosa de amoníaco (~16 %) y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 100 % acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 13,4 g (~42 %) de los compuestos del título (mezcla ~2:1 de los productos 9-Br y 9-I), RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,28 (d, *J* = 7,6 Hz, 0,33H), 8,11 (d, *J* = 6,9 Hz, 0,66H), 7,42-7,38 (m, 1H), 7,28-7,24 (m, 1,33H), 7,23-7,18 (m, 0,66H), 4,77-4,68 (m, 1H), 4,58 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 4,49-4,39 (m, 2H), 4,37-4,30 (m, 2H), 4,08 (dd, *J* = 8,4, 4,5 Hz, 1H), 1,57-1,50 (m, 3H).

15

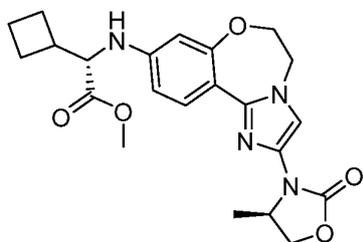
Etapa 3: (*R*)-3-(9-Bromo-5,6-dihidroimidazo[1,2-d][1,4]benzoxazepin-2-il)-4-metil-oxazolidin-2-ona



20 Se separaron 80 mg de una mezcla de (*R*)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-2-il)-4-metiloxazolidin-2-ona y (*R*)-3-(9-yodo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-2-il)-4-metiloxazolidin-2-ona por SFC quiral para proporcionar 27,6 mg del compuesto del título. CLEM (IEN): [M+H]<sup>+</sup> = 364,0 / 366,0 / 367,2; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,22 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,31 (dd, *J* = 8,7, 2,1 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 4,65-4,54 (m, 2H), 4,49-4,43 (m, 4H), 4,09-4,06 (m, 1H), 1,42 (d, *J* = 6,0 Hz).

25

Etapa 4: (*S*)-2-Ciclobutil-2-((*R*)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetato de metilo



30

35 Una mezcla de (*4R*)-3-(9-bromo-5,6-dihidroimidazo[1,2-d][1,4]benzoxazepin-2-il)-4-metil-oxazolidin-2-ona (0,2746 mmol, 100 mg), yoduro cuproso (0,084 mmol, 16 mg), ácido (*2S*)-2-amino-2-ciclobutil-acético (1,10 mmol, 142 mg) y fosfato de potasio tribásico (1,37 mmol, 297 mg) en dimetilsulfóxido (3 ml) se calentó bajo irradiación de microondas a 120 °C durante 2 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se añadió yodometano (1,4 mmol, 0,086 ml) y la reacción se extrajo con diclorometano y agua. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y evaporaron al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (24 g de sílice, gradiente de disolvente: 5 a 40 % de acetato de isopropilo:metanol 3:1 en diclorometano) para proporcionar 100 mg (85 %) del compuesto del título.

Etapa 5: (S)-2-Ciclobutil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida

5 A una solución de (2S)-2-ciclobutil-2-[[2-((4R)-4-metil-2-oxo-oxazolidin-3-il)-5,6-dihidroimidazo[1,2-d][1,4]benzoxazepin-9-il]amino]acetato de metilo (0,234 mmol, 100 mg) en tetrahidrofurano (5 ml) se añadió agua (0,45 ml) y monohidrato de hidróxido de litio (0,357 mmol, 15 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. La mezcla de reacción se evaporó al vacío. A una solución del residuo resultante en *N,N*-dimetilformamida (3 ml) se añadió hexafluorofosfato de 3 óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo [4,5-*b*]piridinio (0,353 mmol, 137 mg), cloruro de amonio (0,71 mmol, 38 mg) y *N,N*-diisopropiletilamina (0,705 mmol, 0,123 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo resultante se trató con agua y, a continuación, se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio y se evaporaron al vacío. El producto bruto se purificó por HPLC de fase inversa, seguida de SFC y se liofilizó para proporcionar 15,0 mg (15 %) de **102**. CLEM (IEN): R<sub>T</sub> (min) = 3,03, [M+H]<sup>+</sup> = 412,2, procedimiento = D; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,96 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,39-7,36 (s an., 1H), 7,13 (s, 1H), 7,00-6,97 (s an., 1H), 6,44 (dd, *J* = 8,9, 2,3 Hz, 1H), 6,14 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 5,96 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 4,62-4,49 (m, 2H), 4,38-4,28 (m, 4H), 4,06-4,03 (m, 1H), 3,70-3,61 (m, 1H), 2,06-1,75 (m, 6H), 1,42-1,34 (m, 3H).

20 Ejemplo 103 (S)-2-Ciclopropil-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida **103**

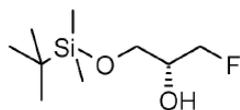
Una mezcla de (S)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-2-il)-4-(difluorometil)oxazolidin-2-ona del Ejemplo 101, etapa 12 (400 mg, 1,00 mmol), *L*-ciclopropilglicina (230 mg, 2,00 mmol), yoduro cuproso (38 mg, 0,20 mmol) y fosfato de potasio tribásico (424 mg, 2,00 mmol) en dimetilsulfóxido (2,0 ml) se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla se calentó a 100 °C durante 5 horas y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con dimetilsulfóxido (5,0 ml) y cloruro de amonio (320 mg, 6,00 mmol) y se añadió trietilamina (1,4 ml, 10,0 mmol). A continuación, a la suspensión agitada se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (2,28 g, 6,0 mmol), en porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla resultante se diluyó con una solución acuosa de amoniaco al 15 % y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 7 % de metanol en acetato de etilo). El residuo se disolvió en un mínimo de acetonitrilo. A continuación, se añadió agua para precipitar un sólido que se recogió por filtración y se secó al vacío para proporcionar 324 mg (75 %) de **103** como un sólido blanquecino. CLEM (IEN): R<sub>T</sub> (min) = 3,21, [M+H]<sup>+</sup> = 434, procedimiento = A; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,98 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,40 (s an., 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (s an., 1H), 6,71 (t, *J* = 56,0 Hz, 1H), 6,42 (dd, *J* = 8,9, 2,4 Hz, 1H), 6,24 (d, *J* = 7,2 Hz, 1H), 6,09 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 5,01-4,89 (m, 1H), 4,63-4,51 (m, 2H), 4,38-4,29 (m, 4H), 3,15 (t, *J* = 7,7 Hz, 1H), 1,16-1,05 (m, 1H), 0,56-0,44 (m, 3H), 0,33-0,25 (m, 1H).

40 Ejemplo 104 (S)-2-Ciclopropil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida **104**

45 Una mezcla de (R)-3-(9-bromo-5,6-dihidroimidazo[1,2-d][1,4]benzoxazepin-2-il)-4-metil-oxazolidin-2-ona (Ejemplo 102, etapa 3) (1,098 mmol, 400 mg), yoduro cuproso (0,330 mmol, 62,8 mg), ácido (2S)-2-amino-2-ciclopropilacético (3,295 mmol, 379,3 mg) y fosfato de potasio tribásico (4,393 mmol, 951,5 mg) en dimetilsulfóxido (35 mmol, 2,5 ml) se calentó a 110 °C durante 2 horas bajo irradiación de microondas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente. A la mezcla de reacción se le añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (12,08 mmol, 4260 mg), cloruro de amonio (12,08 mmol, 646 mg) y trietilamina (1,53 ml, 11,0 mmol). Después de 20 minutos a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se trató con agua y luego se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El producto bruto se purificó por HPLC de fase inversa y se liofilizó para proporcionar 110 mg (25 % en 2 etapas) de **104**. CLEM (IEN): R<sub>T</sub> (min) = 2,588, [M+H]<sup>+</sup> = 398,2, procedimiento = B; RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,96 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H), 7,39 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 7,13 (s, 1H), 7,02 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H), 6,42 (dd, *J* = 8,9, 2,4 Hz, 1H), 6,20 (d, *J* = 7,1 Hz, 1H), 6,09 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 4,61-4,49 (m, 2H), 4,40-4,27 (m, 4H), 4,10-3,99 (m, 1H), 3,22-3,09 (m, 1H), 1,42-1,36 (m, 3H), 1,16-1,04 (m, 1H), 0,56-0,42 (m, 3H), 0,32-0,27 (m, 1H).

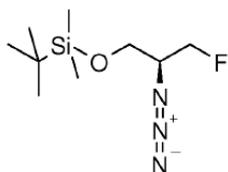
60 Ejemplo 105 (S)-2-Ciclopropil-2-((2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida **105**

Etapa 1: (R)-1-(*terc*-Butildimetilsilanoiloxi)-3-fluoropropan-2-ol



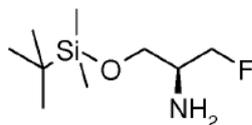
5 Se añadió cloruro de *tert*-butildimetilsililo (1,60 g, 10,63 mmol) a una solución de (*R*)-3-fluoropropano-1,2-diol (1,00 g, 10,6 mmol), trietilamina (1,93 ml, 13,8 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (cant. catalítica) en diclorometano a 0 °C y se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con diclorometano. Las fracciones orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 40 % acetato de etilo en ciclohexano) para dar 1,80 g (81 %) del compuesto del título como un aceite incoloro. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,45-4,36 (m, 1H), 4,34-4,25 (m, 1H), 3,87-3,73 (m, 1H), 3,66-3,56 (m, 2H), 2,30 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 0,82 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Etapa 2: (*S*)-2-Acido-3-fluoropropoxi)-*tert*-butildimetilsilano



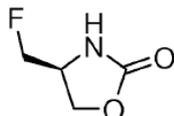
15 Se añadió anhídrido trifluorometanosulfónico (1,67 ml, 9,93 mmol) gota a gota a una solución de (*R*)-1-(*tert*-butildimetilsilanilo)-3-fluoropropan-2-ol (1,80 g, 8,60 mmol) y piridina (1,2 ml, 13,8 mmol) en diclorometano a -20 °C y la mezcla de reacción se agitó a -20 °C durante 20 minutos y, a continuación, a 0 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con HCl acuoso 0,5 N y se extrajo con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo se disolvió en *N,N*-dimetilformamida (5,0 ml) y se añadió ácido sódica (1,68 g, 25,9 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla resultante se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío para proporcionar el compuesto del título en bruto que se utilizó sin purificación. RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,58-4,26 (m, 2H), 3,75-3,63 (m, 2H), 3,62-3,46 (m, 1H), 0,80 (s, 9H), 0,00 (s, 6H).

Etapa 3: (*S*)-1-(*tert*-Butildimetilsilaniloximetil)-2-fluoroetilamina



30 Se añadió hidróxido de paladio (400 mg, 20 % en carbono) a una solución de ((*S*)-2-acido-3-fluoropropoxi)-*tert*-butildimetilsilano (bruto, se asumen 8,60 mmol) en acetato de etilo (15 ml) y metanol (5,0 ml) y la mezcla de reacción se agitó bajo un globo de hidrógeno durante 16 horas. La mezcla resultante se filtró, se añadió hidróxido de paladio nuevo (400 mg, 20 % en carbono) y la reacción se agitó bajo un globo de hidrógeno durante otras 16 horas. La mezcla resultante se filtró y el filtrado se evaporó al vacío para proporcionar el compuesto del título como una mezcla 2:1 de producto y material de partida, que se utilizó sin purificación.

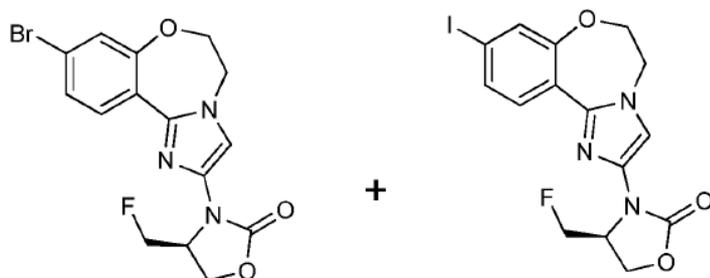
Etapa 4: (*S*)-4-Fluorometiloxazolidin-2-ona



40 Se añadió HCl en dioxano (4 N, 2,0 ml, 8,00 mmol) a una solución de (*S*)-1-(*tert*-butildimetilsilaniloximetil)-2-fluoroetilamina (bruto, se asumen 8,60 mmol) en metanol (3,0 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla de reacción se evaporó al vacío. El residuo resultante se disolvió en una mezcla de tolueno (20 ml) y KOH (2,89 g, 51,6 mmol, 12,5 % ac.) a 0 °C. A esta mezcla se le añadió, gota a gota, fosgeno (13,6 ml, 20 % en tolueno), se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla resultante se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo resultante se extrajo con alcoholes desnaturalizados industriales calientes. El filtrado se evaporó al vacío y el residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre

gel de sílice (gradiente de disolvente: 50 a 100 % de acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 450 mg (44 %, 3 etapas) del compuesto del título como un sólido blanquecino. RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,69 (s an., 1H), 4,59-4,42 (m, 2H), 4,42-4,32 (m, 1H), 4,25-4,08 (m, 2H).

- 5 Etapa 5: (S)-3-(9-Bromo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona y (S)-3-(9-Yodo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona



- 10 Una mezcla de 9-bromo-2-yodo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepina (722 mg, 1,85 mmol), (S)-4-fluorometiloxazolidin-2-ona (220 mg, 1,85 mmol), 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina (131 mg, 0,55 mmol),  $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (74 mg, 0,37 mmol), carbonato de potasio (510 mg, 3,70 mmol) y dioxano (6,0 ml) se selló en un tubo y la mezcla se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 72 horas. La mezcla de reacción resultante se diluyó con amoníaco acuoso al 15 % y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 100 % acetato de etilo en ciclohexano) para proporcionar 390 mg (53 %) de los compuestos del título (mezcla ~2:1 de los productos 9-Br y 9-I). CLEM (IEN):  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 382 / 384 / 430$ ; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,22 (d,  $J = 9,3$  Hz, 0,7H), 8,05 (d,  $J = 8,8$  Hz, 0,3H), 7,43-7,37 (m, 0,6H), 7,29 (s, 1,2H), 7,23-7,18 (m, 1,2H), 5,03-4,66 (m, 3H), 4,60 (t,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 4,54 (dd,  $J = 8,6, 4,3$  Hz, 1H), 4,47-4,43 (m, 2H), 4,37-4,33 (m, 2H).
- 15
- 20

Etapa 6: (S)-2-Ciclopropil-2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida

- 25 Una mezcla de (S)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona y (S)-3-(9-yodo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona (195 mg, mezcla ~2:1 Br:I, ~0,49 mmol), *L*-ciclopropilglicina (104 mg, 0,90 mmol), yoduro cuproso (17 mg, 0,09 mmol) y fosfato de potasio tribásico (190 mg, 0,90 mmol) en dimetilsulfóxido (1,5 ml) se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 16 horas y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con dimetilsulfóxido (1,0 ml) y cloruro de amonio (144 mg, 2,70 mmol) y se añadió trietilamina (950  $\mu\text{l}$ , 6,75 mmol). A continuación, a esta mezcla se le añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (1,54 g, 4,05 mmol) en porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla resultante se diluyó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo bruto resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 5 % de metanol en diclorometano) y, a continuación, se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 100 % de acetato de metilo en ciclohexano) para proporcionar 90 mg (48 %) de **105** como un sólido blanquecino. CLEM (IEN):  $R_T$  (min) = 2,76,  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 416$ , procedimiento = A; RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  7,94 (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H), 7,40 (s an., 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (s an., 1H), 6,41 (dd,  $J = 8,8, 2,3$  Hz, 1H), 6,22 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H), 6,09 (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H), 4,99 (ddd,  $J = 48,3, 9,8, 2,5$  Hz, 1H), 4,81-4,56 (m, 3H), 4,40 (dd,  $J = 8,6, 3,9$  Hz, 1H), 4,37-4,29 (m, 4H), 3,15 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 1,16-1,05 (m, 1H), 0,54-0,43 (m, 3H), 0,33-0,25 (m, 1H).
- 30
- 35
- 40

- 45 Ejemplo 106 (S)-2-((S)-4-(Fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida **106**

- Una mezcla de (S)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona y (S)-3-(9-yodo-5,6-dihidrobencof[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(fluorometil)oxazolidin-2-ona (Ejemplo 105, etapa 5) (195 mg, mezcla ~2:1 9-Br: 9-I, ~0,49 mmol), *L*-alanina (87 mg, 0,98 mmol), yoduro cuproso (17 mg, 0,09 mmol) y fosfato de potasio tribásico (208 mg, 0,98 mmol) en dimetilsulfóxido (3,0 ml) se desgasificó con argón en un baño ultrasónico. La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 4 horas y, a continuación, se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla resultante se diluyó con dimetilsulfóxido (3,0 ml) y cloruro de amonio (157 mg, 2,94 mmol) y se añadió trietilamina (683  $\mu\text{l}$ , 4,8 mmol). A continuación, a esta mezcla se le añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (1,10 g, 2,94 mmol) en porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla resultante se diluyó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos
- 50
- 55

combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y evaporaron al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 5 % de metanol en diclorometano) y, a continuación, se purificó adicionalmente por cromatografía de fluido supercrítico quiral para proporcionar 36 mg (19 %) de **106** como un sólido blanquecino. CLEM (IEN):  $R_T$  (min) = 2,43,  $[M+H]^+$  = 390, procedimiento = A; RMN de  $^1H$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,96 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H), 7,37 (s an., 1H), 7,17 (s, 1H), 7,00 (s an., 1H), 6,39 (dd,  $J$  = 8,6, 1,6 Hz, 1H), 6,15 (d,  $J$  = 7,0 Hz, 1H), 6,09 (d,  $J$  = 1,6 Hz, 1H), 5,08-4,55 (m, 5H), 4,42-4,28 (m, 4H), 3,76 (quint.,  $J$  = 7,2 Hz, 1H), 1,30 (d,  $J$  = 7,2 Hz, 3H).

**Ejemplo 107** (S)-2-((S)-4-(Difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)butanamida **107**

Una mezcla de (S)-3-(9-bromo-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-2-il)-4-(difluorometil)oxazolidin-2-ona (Ejemplo 101, etapa 12) (240 mg, 0,60 mmol), ácido (S)-2-aminobutírico (124 mg, 1,19 mmol), yoduro cuproso (22,8 mg, 0,119 mmol), fosfato de potasio tribásico (255 mg, 1,19 mmol) y dimetilsulfóxido (6,0 ml) se agitó bajo argón a 100 °C durante 6 horas. La mezcla resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente y, a continuación, se añadieron cloruro de amonio (188 mg, 3,52 mmol) y trietilamina (1,2 ml, 8,80 mmol). A la suspensión agitada se añadió hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-*bis*(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (2,01 g, 5,28 mmol), en porciones y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla resultante se diluyó con acetato de etilo, se lavó con cloruro de amonio saturado, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó al vacío. El producto bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (gradiente de disolvente: 0 a 10 % de metanol en acetato de etilo), se purificó adicionalmente por HPLC de fase inversa y, a continuación, por cromatografía de fluido supercrítico quiral para proporcionar 73,6 mg (30 %) de **107** como un sólido blanco. CLEM (IEN):  $R_T$  (min) = 3,13,  $[M + H]^+$  = 422, procedimiento = A;  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7,99 (d,  $J$  = 8,8 Hz, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,17 (s, 1H), 7,03 (s, 1H), 6,71 (t,  $J$  = 56,0 Hz, 1H), 6,44 (dd,  $J$  = 8,8, 2,2 Hz, 1H), 6,13 (d,  $J$  = 2,2 Hz, 1H), 6,09 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 5,02-4,89 (m, 1H), 4,62-4,53 (m, 2H), 4,41-4,27 (m, 4H), 3,65-3,60 (m, 1H), 1,72-1,59 (m, 2H), 0,94 (t,  $J$  = 7,3 Hz, 3H).

**Ejemplo 901** Ensayo de unión a p110 $\alpha$  (alfa) de PI3K

Los ensayos de unión a PI3K están destinados a determinar la potencia bioquímica de los inhibidores de PI3K de molécula pequeña. La reacción de la lípido-cinasa PI3K se realiza en presencia del sustrato lipídico PIP2:3PS (Promega n.º V1792) y ATP. Después de la terminación de la reacción de la cinasa, el recambio de ATP a ADP por la fosforilación del sustrato lipídico se detecta usando el ensayo Promega ADP-Glo™ (Promega n.º V1792). Las reacciones se llevan a cabo utilizando las siguientes condiciones para cada isoforma de PI3K como en la Tabla 5.

Tabla 5.

Cinasa	Fuente	Concentración final de cinasa	ATP ( $\mu$ M)	PIP2:3PS ( $\mu$ M)	Tiempo de reacción (min)
PI3K alfa	Millipore n.º 14-602-K	0,2 nM	40	50	120
PI3K beta	Promega n.º V1751	0,6 nM	40	50	120
PI3K delta	Millipore n.º 14-604-K	0,25 nM	40	50	120
PI3K gamma	Millipore n.º 14-558-K	0,4 nM	25	50	120

Después de 120 minutos de tiempo de reacción, la reacción de la cinasa se termina. Cualquier ATP restante después de que la reacción se agota, dejando solo ADP. A continuación, se agrega el reactivo de detección de cinasa para convertir el ADP en ATP, que se usa en una reacción acoplada luciferina/luciferasa. La salida luminiscente se mide y se correlaciona con la actividad de la cinasa.

Todas las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. Para cada isoforma de PI3K se agrega una mezcla de 3  $\mu$ l (1:1) de solución de enzima / sustrato lipídico a una placa de ensayo blanca de 384 pocillos (Perkin Elmer n.º 6007299) que contiene 50 nl de compuesto de prueba o DMSO solo para controles no tratados. La reacción se inicia por la adición de 2  $\mu$ l de ATP/MgCl<sub>2</sub>. El tampón de reacción de cinasa contiene HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, BSA al 0,01 %, DMSO al 1 % y las concentraciones de enzima y de sustrato como se indica en la tabla anterior. La reacción se detiene mediante la adición de 10  $\mu$ l de reactivo ADP-Glo. Las placas se leen en un sistema Perkin Elmer Envision utilizando el modo de luminiscencia. Se generan curvas de respuesta de dosis de 10 puntos para cada compuesto de prueba. Los valores de  $K_i$  para cada compuesto se determinan usando la ecuación de Morrison.

Ensayos de unión: Los experimentos iniciales de polarización se realizaron en un Analyst HT 96-384 (Molecular

Devices Corp, Sunnyvale, CA.). Las muestras para las mediciones de afinidad por polarización de fluorescencia se prepararon mediante la adición de diluciones en serie 1:3 de p110alfa de PI3K (Upstate Cell Signaling Solutions, Charlottesville, VA) a partir de una concentración final de 20 µg/ml en tampón de polarización (Tris 10 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, Chaps al 0,05 % y DTT 1 mM) hasta una concentración final de PIP<sub>2</sub> 10 mM (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.). Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron mediante la adición de GRP-1 y la sonda PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) a concentraciones finales de 100 nM y 5 nM, respectivamente. Se realizó la lectura con filtros de corte estándar para el fluoróforo rodamina ( $\lambda_{ex}$  = 530 nm;  $\lambda_{em}$  = 590 nm) en placas Proxiplates® negras de bajo volumen de 384 pocillos (PerkinElmer, Wellesley, MA). Los valores de polarización de fluorescencia se representaron en función de la concentración de proteína. Los valores de CE<sub>50</sub> se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de cuatro parámetros usando el programa informático KaleidaGraph® (Synergy Software, Reading, PA). Este experimento también establece la concentración de proteína adecuada para su uso en posteriores experimentos de competencia con inhibidores.

Los valores de CI<sub>50</sub> del inhibidor se determinaron mediante la adición de 0,04 mg/ml de p110alfa de PI3K (concentración final) combinada con PIP<sub>2</sub> (concentración final de 10 mM) a los pocillos que contienen diluciones en serie 1:3 de los antagonistas en una concentración final de ATP de 25 mM (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) en el tampón de polarización. Después de un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las reacciones se detuvieron mediante la adición de GRP-1 y la sonda PIP3-TAMRA (Echelon-Inc., Salt Lake City, UT.) a concentraciones finales de 100 nM y 5 nM, respectivamente. Se realizó la lectura con filtros de corte estándar para el fluoróforo rodamina ( $\lambda_{ex}$  = 530 nm;  $\lambda_{em}$  = 590 nm) en placas Proxiplates® negras de bajo volumen de 384 pocillos (PerkinElmer, Wellesley, MA). Los valores de polarización de fluorescencia se representaron en función de la concentración de antagonista, y los valores de CI<sub>50</sub> se obtuvieron ajustando los datos a una ecuación de 4 parámetros en el programa informático Assay Explorer (MDL, San Ramon, CA).

De forma alternativa, la inhibición de PI3K se determinó en un ensayo radiométrico usando enzima recombinante purificada y ATP a una concentración de 1 µM (micromolar). Se realizaron diluciones en serie del compuesto en DMSO al 100 %. La reacción de la cinasa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y la reacción se terminó mediante la adición de PBS. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron posteriormente usando un ajuste sigmoide de la curva dosis-respuesta (pendiente variable).

#### Ejemplo 902 Inhibición selectiva de PI3K $\alpha$ (alfa) mutante

La capacidad de un compuesto de la invención de actuar preferentemente contra células que contienen PI3K $\alpha$  (alfa) mutante se determinó midiendo la inhibición de la vía de PI3K en líneas celulares isogénicas SW48: PI3K $\alpha$  natural (original), con mutación E545K de dominio helicoidal y con mutación H1047R de dominio cinasa. Los siguientes ensayos están destinados a determinar la potencia celular y la selectividad por el mutante de los inhibidores de PI3K $\alpha$  de molécula pequeña. El ensayo utiliza líneas celulares isogénicas que expresan PI3K $\alpha$  WT, PI3K $\alpha$  con mutación E545K/+ (Horizon Discovery 103-001) o PI3K $\alpha$  con mutación H1047R/+ (Horizon Discovery 103-005). La potencia de la inhibición de pPRAS40 por PI3K $\alpha$  en cada línea celular se mide después de 24 horas de tratamiento con el compuesto. La selectividad por el mutante de los inhibidores de PI3K $\alpha$  se determina por los cocientes de potencia CE<sub>50</sub> en las líneas celulares WT frente a E545K y en las líneas celulares WT frente a H1047R.

Cultivo celular: Las líneas celulares se mantienen en una incubadora de cultivo celular a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo celular que contiene RPMI1640 (preparado en Genentech), FBS al 10 % (Gibco 16140-071), L-glutamina 2 mM (preparada en Genentech) y HEPES 10 mM pH 7,2 (preparado en Genentech). Las células se dividen cada 72 horas en una proporción 1:8 utilizando tripsina-EDTA al 0,25 % (Gibco 25200).

Procedimientos de ensayo: Las células se cosechan y se siembran en placas de ensayo tratadas con cultivo de tejido de 384 pocillos (Greiner, ref. 781091) y se incuban durante la noche a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las tres líneas celulares (WT, E545K y H1047R) se siembran y se analizan en paralelo. Al día siguiente, los compuestos de prueba se diluyen en serie en dimetilsulfóxido (DMSO) y se agregan a las células (concentración final de DMSO del 0,5 %). A continuación, las células se incuban durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas, se lisan las células y se miden los niveles de pPRAS40 usando el kit de ensayo pPRAS40 384w personalizado de Meso-Scale (Meso Scale Discovery, ref. L21CA-1). Los lisados celulares se añaden a las placas de ensayo recubiertas previamente con anticuerpos contra PRAS40 fosforilado. Se permite que el PRAS40 fosforilado de las muestras se una a los anticuerpos de captura durante la noche a 4 °C. El anticuerpo de detección (anti-PRAS40 total, marcado con un SULFO-TAG electroquimioluminiscente) se añade al lisado unido y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El tampón de lectura MSD se añade de modo que cuando se aplica un voltaje a los electrodos de la placa, las etiquetas unidas a la superficie del electrodo emiten luz. El instrumento MSD Sector mide la intensidad de la luz y mide cuantitativamente la cantidad de fósforo-PRAS40 en la muestra. El porcentaje de inhibición de la fosforilación de PRAS40 por concentraciones variables de los compuestos de prueba se calcula en relación con controles no tratados. Los valores de CE<sub>50</sub> se calculan utilizando el modelo de dosis-respuesta de regresión logística no lineal de 4 parámetros.

Análisis estadístico: Los valores de CE<sub>50</sub> representan la media geométrica de un mínimo de 4 experimentos

independientes. Todas las estadísticas se realizaron con el programa informático KaleidaGraph (versión 4.1.3). Se realizó una prueba de la *t* de Student utilizando datos no emparejados con la misma varianza para comparar la actividad contra las células mutantes y las células naturales.  $P < 0,05$  se considera significativo.

#### 5 Ejemplo 903 Ensayo de viabilidad de las células *in vitro*

Se sembraron las células (1500 células/pocillo) en placas de 384 pocillos durante 16 h. En el día 2, se prepararon nueve diluciones en serie 1:3 del compuesto en DMSO en una placa de 96 pocillos. A continuación, los compuestos se diluyeron en medios de crecimiento usando un robot Rapidplate (Zymark Corp.). A continuación, se añadieron los compuestos diluidos a pocillos por cuadruplicado en placas de células de 384 pocillos y se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 4 días, se midieron los números de células viables relativos mediante luminiscencia usando Cell-Titer Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se leyeron en un lector Wallac Multilabel Reader (Perkin-Elmer). Se calcularon los valores de CE<sub>50</sub> usando el programa informático Prism 6.0 (GraphPad).

#### 15 Ejemplo 904 Eficacia del xenoinjerto de tumor de ratón *in vivo*

Ratones: Los ratones hembra con inmunodeficiencia combinada severa (CB-17 SCID.bg Charles River Labs, San Diego), ratones NOD.SCID (Charles River Labs, Hollister) o ratones NCR.nude (Taconic) tenían de 8 a 9 semanas de edad y tenían un intervalo de peso corporal de 18 a 26 gramos el día 0 del estudio. Los animales recibieron agua a voluntad y una dieta Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010 (LabDiet St. Louis, MO). Los ratones fueron alojados en microaisladores en un ciclo de luz de 12 horas. Genentech cumple específicamente con las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio con respecto a la restricción, la cría, los procedimientos quirúrgicos, la regulación de alimentos y líquidos y la atención veterinaria. El programa de cuidado y uso de animales de Genentech está acreditado por la Asociación para la evaluación y acreditación del cuidado de los animales de laboratorio (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, AAALAC), que garantiza el cumplimiento de las normas aceptadas para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Los ratones se alojaron en Genentech en jaulas de microaisladores para roedores estándar y se aclimataron a las condiciones del estudio durante al menos 3 días antes del implante de células tumorales. Solo se utilizaron para el estudio los animales que parecían estar sanos y que estaban libres de anomalías obvias.

Implante del tumor: Los xenoinjertos se iniciaron con células cancerosas (HCC1954x1 o KPL4) o con tumores de paso (HCI-003). Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino al 10 %, glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml (microgramos por ml) de sulfato de estreptomina y 25 µg/ml de gentamicina, recolectadas en el crecimiento en fase logarítmica. y resuspendidas en Matrigel libre de fenol rojo al 50 % (Becton Dickinson Bioscience; San José, CA) y solución salina equilibrada de Hank a una concentración de  $3 \times 10^6$  o  $5 \times 10^6$  células/ml dependiendo del tiempo de duplicación de la línea celular. Para el modelo derivado del paciente HCI-003, se implantaron subcutáneamente 30 mg de pellets de cera de abejas que contenían aproximadamente 1 mg de 17β (beta)-estradiol 3 días antes del implante de fragmentos tumorales. Se implantaron células o fragmentos tumorales en la almohadilla de grasa mamaria 2/3, y se monitorizó el crecimiento tumoral a medida que el tamaño promedio se acercaba al intervalo objetivo de 100 a 250 mm<sup>3</sup>. Cuando la mayoría de los tumores alcanzaron el intervalo objetivo, los ratones se distribuyeron en grupos de 7-10 ratones en base al volumen del tumor.

Agentes terapéuticos: Los compuestos contra PI3K se suministraron como una base libre en polvo seco y se almacenaron a temperatura ambiente protegidos de la luz. El vehículo para taselisib (GDC-0032) y BYL719 fue metilcelulosa al 0,5 %: Tween 80 al 0,2 % (MCT) en agua desionizada. El control del vehículo para el compuesto **101** fue una nanosuspensión de metilcelulosa al 0,5 % / Tween-80 al 0,2 % (MCT). La nanosuspensión de MCT se prepara preparando inicialmente una suspensión MCT. Una vez preparada, se utilizan perlas de vidrio de 1 mm y una barra de agitación magnética de tierras raras para moler la suspensión de MCT durante aproximadamente 24 horas en una fina nanosuspensión. Se usó un analizador de tamaño de partícula para verificar el tamaño de partícula final. Las dosis del fármaco se prepararon semanalmente y se almacenaron a 4 °C.

Tratamiento: Los ratones recibieron (vehículo o) la dosificación en mg/kg indicada de los compuestos contra PI3K (expresada como equivalente de base libre), PO por alimentación por sonda gástrica diaria durante 21-28 días en un volumen de 100 µl (microlitros) (5 ml/kg).

Criterio de valoración: El volumen del tumor se midió en 2 dimensiones (largo y ancho), usando calibres Ultra Cal IV (Modelo 54 10 111; Fred V. Fowler Company), como sigue: volumen del tumor (mm<sup>3</sup>) = (largo x ancho<sup>2</sup>) x 0,5 y se analizó con Excel versión 11.2 (Microsoft Corporation). Se utilizó un enfoque de un modelado de efectos mixtos lineales (LME) para analizar la medición repetida de los volúmenes tumorales de los mismos animales a lo largo del tiempo (Pinheiro J, *et al.* "nlme: linear and nonlinear mixed effects models", 2009; paquete R versión 3.2.5. Este enfoque aborda tanto las mediciones repetidas como los abandonos moderados debidos a cualquier muerte de animales no relacionada con el tratamiento antes del final del estudio. Se utilizaron splines de regresión cúbica para ajustar un perfil no lineal a los cursos de tiempo del volumen tumoral log<sub>2</sub> en cada nivel de dosis. Estos perfiles no lineales se relacionaron a continuación con la dosis dentro del modelo mixto. La inhibición del crecimiento

tumoral como porcentaje del grupo tratado con control de vehículo (% ICT) se calculó como el porcentaje del área bajo la curva (ABC) ajustada para el grupo de dosis respectivo por día en relación con el vehículo, usando la siguiente fórmula:  $\% \text{ ICT} = 100 \times (1 - \text{ABC}_{\text{dosis}} / \text{ABC}_{\text{vehículo}})$  Con esta fórmula, un valor de ICT del 100 % indica estasis tumoral, un valor de ICT de más del (>) 1 % pero menos del (<) 100 % indica un retraso en el crecimiento del tumor y un valor de ICT de más del (>) 100 % indica regresión tumoral. La respuesta parcial (RP) para un animal se definió como una regresión tumoral de más del (>) 50 % pero menos del (<) 100 % del volumen tumoral inicial. La respuesta completa (RC) se definió como un 100 % de regresión tumoral (es decir, sin tumor medible) en cualquier día durante el estudio.

10 Toxicidad: Los animales se pesaron diariamente durante los primeros cinco días del estudio y dos veces por semana después de esto. El peso corporal de los animales se midió usando una báscula Adventurer Pro® AV812 (Ohaus Corporation). El porcentaje de cambio de peso se calculó como sigue:  $\text{cambio de peso corporal (\%)} = [(\text{peso}_{\text{día nuevo}} - \text{peso}_{\text{día 0}}) / \text{peso}_{\text{día 0}}] \times 100$ . Los ratones se observaron con frecuencia para detectar signos evidentes de cualquier efecto secundario adverso relacionado con el tratamiento, y se registraron los signos  
15 clínicos de toxicidad cuando se observaron. La toxicidad aceptable se define como una pérdida media de peso corporal (BW) del grupo de menos del 20 % durante el estudio y no más de una muerte relacionada con el tratamiento (RT) por cada diez animales tratados. Cualquier régimen de dosificación que dé como resultado una mayor toxicidad se considera por encima de la dosis máxima tolerada (DMT). Una muerte se clasifica como RT si es atribuible a los efectos secundarios del tratamiento como lo demuestran los signos clínicos y/o la necropsia, o  
20 también se puede clasificar como RT si se debe a causas desconocidas durante el período de dosificación o dentro de los 10 días posteriores a la última dosis. Una muerte se clasifica como NRT si no hay pruebas de que la muerte esté relacionada con los efectos secundarios del tratamiento.

#### 25 Ejemplo 905 Cultivo celular y experimentos de inhibidores *in vitro*

Las líneas celulares se cultivaron en condiciones estándar de cultivo de tejidos en medio RPMI con suero fetal bovino al 10 %, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. HCC-1954 y HDQ-P1 son líneas celulares de cáncer de mama (American Type Culture Collection; Manassas, VA). Las células HCC-1954 y HDQ-P1 se colocaron en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 6 pocillos a 80 000 células/pocillo y se incubaron a  
30 37 °C durante la noche. Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de cada compuesto durante 24 horas. Después de la incubación, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría y se lisaron en tampón de extracción celular Biosource™ (Invitrogen; Carlsbad, CA) complementado con inhibidores de proteasa (F. Hoffman-LaRoche; Mannheim, Alemania), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y cócteles de inhibidores de fosfatasa 1 y 2 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Las concentraciones de proteínas se  
35 determinaron usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific; Rockford, IL).

#### Ensayo de proteínas

La concentración de proteína se determinó usando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Rockford, IL). Para  
40 las inmunotransferencias, se separaron cantidades iguales de proteína por electroforesis a través de geles de gradiente NuPage Bis-Tris 4-12 % (Invitrogen; Carlsbad, CA); las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el sistema IBlot y el protocolo de InVtrogen. Los anticuerpos contra p110alfa y fosfo-Akt (Ser473) se obtuvieron de Cell Signaling (Danvers, MA). Los anticuerpos contra β-actina y GAPDH eran de Sigma.

45 Ejemplo 906 Expresión de CD69 en linfocitos B, ensayo de sangre humana completa para expresión de CD69 en linfocitos B CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>

Cultivo celular: Se dispensó sangre humana completa en placas de 96 pocillos a 100 µl por pocillo. Los compuestos se diluyeron en DMSO para generar las concentraciones de stock deseadas y, a continuación, se diluyeron  
50 adicionalmente en PBS a la concentración de trabajo deseada y se añadieron en un volumen de 5,5 µl por pocillo. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub> antes de la adición de 5 µg (10 µl por pocillo) de anti-F(ab')<sub>2</sub> de IgM de cabra (Southern Biotech, AL) y se incubaron durante 18 horas a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Todos los tratamientos fueron sometidos a prueba por duplicado.

55 Procedimientos de aislamiento y tinción celular: Después de la incubación, el nivel de expresión de CD69 en las células CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> se determinó tiñendo las muestras de sangre completa con un cóctel de 10 µl/pocillo de CD27 (clon L128; BD Biosciences, NJ), 7,5 µl/pocillo de CD19 (clon SJ25C1; BD Biosciences, NJ) y 10 µl de CD69 (clon FN50; BD Biosciences, NJ). Además, la sangre humana completa de cada donante se tiñó con anticuerpos de control fluorescente con isotipo compatible. Después de la adición del cóctel de anticuerpos apropiado, las  
60 muestras de sangre completa se tiñeron durante 30 minutos en la oscuridad y, a continuación, se lisaron usando BD Pharm Lysis (BD Bioscience, NJ). Las muestras resultantes se lavaron a continuación con tampón FACS (solución salina tamponada con fosfato (libre de Ca/Mg<sup>++</sup>), EDTA 1 mM, HEPES 25 mM pH 7,0, suero fetal bovino al 1 % (inactivado por calor) y se fijaron en tampón FACS complementado con formaldehído al 0,1 % (Polysciences Inc, PA) y Pluronic F-68 al 0,1 % (Sigma, MO). Los datos se adquirieron utilizando un BD LSR-II (BD Biosciences)  
65 con el programa informático BD FACSDiva.

5 Expresión de CD69 en linfocitos B CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>: Las células se evaluaron por citometría de flujo para determinar los niveles de CD19, CD27 y CD69 utilizando el programa informático BD FACSDiva y la media de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD69 de la población de linfocitos CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>. La concentración del compuesto que da como resultado una inhibición del 50 % de la media de IMF de CD69 (CI<sub>50</sub>) se determinó usando el programa informático Genedata (Genedata Screener, MA).

Ejemplo 907 CE<sub>50</sub> de pPRAS40 en HCC1954 y HDQP1

10 Las células se cultivan en placas de ensayo tratadas para cultivo de tejidos de 384 pocillos y se incuban durante la noche. Al día siguiente, las células se tratan con los compuestos y se incuban durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se lisan y se miden los niveles de pPRAS40 utilizando la plataforma de ensayo Meso-Scale. Estas líneas celulares son bastante útiles para caracterizar la selectividad de inhibidores de PI3Ka por PI3Ka mutante. La línea celular HCC1954 expresa PI3Ka mutante (E545K) frente a WT en HDQP1.

15 Principio del ensayo: La plataforma MSD proporciona un procedimiento para medir los niveles fosforilados de pPRAS40 en una sola muestra. Los lisados celulares se añaden a las placas de ensayo recubiertas previamente con anticuerpos contra PRAS40 total. Después de la lisis celular, se permite que el PRAS40 de las muestras se una a los anticuerpos de captura. El anticuerpo de detección (antifosfoPRAS40), marcado con un compuesto electroquimioluminiscente MSD SULFO-TAG, se añade al lisado unido. El tampón de lectura MSD se añade de modo que cuando se aplica un voltaje a los electrodos de la placa, las etiquetas unidas a la superficie del electrodo emiten luz. El instrumento MSD Sector mide la intensidad de la luz y mide cuantitativamente la cantidad de fósforEGFR en la muestra (Meso Scale Assay Principle).

25 Materiales:

Placa de ensayo	Placas de fondo negro u-Clear estériles de 384 pocillos, tratadas con TC (Greiner, ref. 781091)
Tipos celulares	Línea original WT: HDQ-P1 (CL131963) Línea con mutación E545K: HCC1954 (CL130216)
Medio	RPMI 1640 FBS al 10 % (Gibco 16140-071) L-Glutamina 2 mM (GNE interna) HEPES al 1 % (GNE interno)
Otros reactivos de cultivo celular	Tripsina EDTA 1X al 0,25 % (Invitrogen Gibco, ref. 25200)
Kit de reactivos de ensayo	Kit de lisado de células completas, Kit de ensayo personalizado pPRAS40 de 384 pocillos (Meso Scale Discovery, ref. L21CA-1 para 100 placas)

Procedimiento:

30 • Compuestos preparados a una concentración de 2 mM en DMSO. Preparar la placa de valoración de compuesto en DMSO, 1:3 en DMSO puro.

• La placa original DMSO contiene 72 µl de 13 compuestos.

35 • Compuesto de control selectivo mutante: Añadir 72 µl de compuesto de control 2 mM al pocillo B2 de cada placa de ensayo. Este compuesto de control demuestra una potencia aproximadamente 20 veces mayor en la línea celular HCC1954 frente a la línea HDQP1.

40 • Usando una pipeta multicanal, transferir 36 µl de cada pocillo con compuesto al pocillo directamente inferior (por ejemplo, de B2 a C2) para establecer curvas de dosis-respuesta duplicadas.

• Usar el procedimiento Biomek Fx titulado "SLS\_serial dilution/1 plate\_384\_3\_13\_3x" para preparar diluciones en serie de compuestos en la placa madre.

45 • Sellar y mantener ambas placas DMSO (original y derivada) con un sellador de calor cuando no se esté usando.

Día 1: Siembra de células

1. Sembrar 12 500 células en 45 µl medio para cada línea celular. Permitir que las células se asienten / unan a la

placa durante 15-20 minutos a temperatura ambiente.

2. Incubar las células durante la noche en una incubadora con control de CO<sub>2</sub> y humedad a 37 °C.

5 Día 2: Preparación de placas de compuesto y tratamiento con el compuesto

1. Para la placa de dilución intermedia 10X: añadir 95 µl de medio libre de suero en una placa de polipropileno Greiner de 384 pocillos de perfil estándar.

10 2. Utilizar el protocolo biomek Fx para la dilución intermedia de compuestos en el medio y adición a células: "SLS Intermed Dil Add 5 ul to Cells July 13 2012". Este protocolo de Biomek transfiere 5 µl de la placa DMSO derivada a la placa de dilución intermedia que contiene 95 µl de medio y mezcla los medios y los compuestos. A continuación, el procedimiento transfiere 5 µl de la placa de dilución intermedia a la placa de células apropiada.

15 3. Incubar las células tratadas a 37 grados durante 24 horas en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Día 3: Lisis celular y adición a placas MSD

20 Bloquear la placa de ensayo MSD con 50 µl de tampón de lavado Blocker A/1X MSD al 3 % 1-2 horas a temperatura ambiente. Esta solución se puede almacenar a 4 °C durante hasta un mes. El tampón de bloqueo A contiene de tampón de lavado MSD 1X. 20 ml de tampón de lavado Tris 1X y 600 mg de bloqueador A.

Preparar el tampón de lisis:

	3 placas (ml)	6 placas (ml)	9 placas (ml)	12 placas (ml)
Tampón de lisis MSD	65,0	120	180	240
Inh. fosfatasa Cóctel 1 (o inhib. fosfatasa 2 de Sigma, ref. P5726-5mL)	0,65	1,2	1,8	2,4
Inh. fosfatasa Cóctel 2 (o inhib. fosfatasa 3 de Sigma, ref. P0044-5mL)	0,65	1,2	1,8	2,4
Inh. proteasa (o Sigma ref. P2714-1BTL resuspendido en 10 ml de PBS)	0,65	1,2	1,8	2,4

25 Aspirar los medios y lisar las células

1. Lisar las células en 50 µl de tampón de lisis. Lisar a temperatura ambiente durante 10-20 minutos en un agitador de placas.

30 2. Mientras las células se lisan, lavar las placas bloqueadas con 1x tampón de lavado MSD.

3. Transferir 42 µl de lisados (21 + 21 µl) a una placa de ensayo MSD pPRAS40 bloqueada.

35 4. Sellar las placas MSD e incubar a 4 °C con agitación durante la noche.

Día 4: Ensayo de MSD / Detección

40 8. Preparar una solución de bloqueador A al 1 % en tampón de lavado 1X MSD (20 ml de tampón de lavado Tris 1X y 200 mg de bloqueador A (1 % p/v). Esta solución se puede almacenar a 4 °C durante hasta un mes.

9. Lavar las placas MSD con tampón de lavado MSD 1x.

45 10. Añadir 10 µl del anticuerpo de detección SULFO-TAG diluido a las placas. Incubar durante 1 h con agitación a temperatura ambiente.

	3 placas (ml)	6 placas (ml)	9 placas (ml)	12 placas (ml)
Bloqueador A al 1 % en tampón de lavado MSD	13,0	25,0	36,0	48,0
Bloqueador DM al 2 % (100X)	0,13	0,25	0,36	0,48
Sulfo-TAG anti-pPRAS40 (50X)	0,26	0,5	0,72	0,96

11. Lavar las placas 4X con tampón de lavado MSD 1X.

50 12. Añadir 35 µl de tampón de lectura 1X con pipeteo inverso para evitar burbujas.

13. Leer la placa inmediatamente en el instrumento MSD SECTOR.

Ejemplo 908 Cocrystalografía con p110 $\alpha$  (alfa)

5

El p110 $\alpha$  (alfa) truncado en el extremo N se produjo de acuerdo con Chen *et al.* y Nacht *et al.* (Chen, P., Y. L. Deng, S. Bergqvist, M. D. Falk, W. Liu, S. Timofeevski y A. Brooun "Engineering of an isolated p110alpha subunit of PI3Kalpha permits crystallization and provides a platform for structure-based drug design". (2014) Protein Sci 23(10): 1332-1340; Nacht, M. *et al.* (2013) "Discovery of a potent and isoform-selective targeted covalent inhibitor of the lipid kinase PI3Kalpha", J. Med. Chem. 56(3): 712-721).

10

Se aplicaron protocolos estándar a la producción de cristales en presencia de los compuestos del proyecto. Los cristales recolectados se conservaron para la obtención de datos de difracción por inmersión en nitrógeno líquido y se montaron en una línea de haz de sincrotrón que produce rayos X monocromáticos. Los datos de difracción se obtuvieron, redujeron y fusionaron utilizando protocolos estándar. Las celdas unitarias cristalográficas y el grupo espacial fueron isomorfos con los reportados previamente (Nacht, 2013; Chen, 2014). La colocación de los compuestos del proyecto en mapas de densidad electrónica y el refinamiento cristalográfico a unos límites de resolución de entre 2,36 y 2,56 Å se realizaron mediante protocolos estándar.

15

20

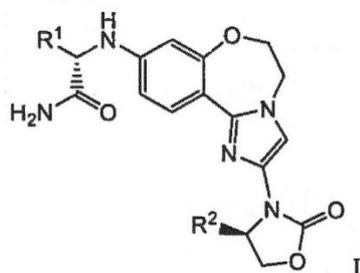
En esta solicitud, las unidades ul, umol, etc. significan  $\mu$ l,  $\mu$ mol, etc.

25

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad de comprensión, no se deben interpretar las descripciones y ejemplos como limitantes del alcance de la invención. Las divulgaciones de toda la literatura científica y de patentes citadas en el presente documento se incorporan expresamente en su totalidad por referencia.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de la Fórmula I:



5

y estereoisómeros, isómeros geométricos, tautómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en los que:

10 R<sup>1</sup> se selecciona de -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ciclopropilo y ciclobutilo;

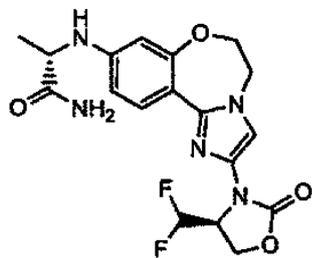
R<sup>2</sup> se selecciona de -CH<sub>3</sub>, -CHF<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>F y -CF<sub>3</sub>.

15 2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub> o ciclopropilo.

3. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que R<sup>2</sup> es -CHF<sub>2</sub>.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

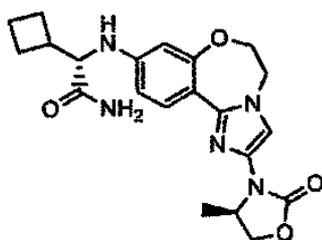
20 (S)-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida que tiene la estructura



25 o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

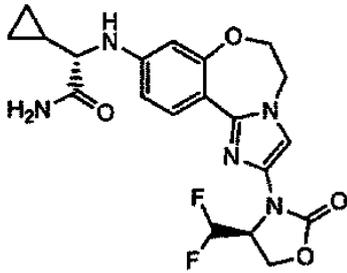
30 (S)-2-ciclobutil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-yl)amino)acetamida que tiene la estructura



35 o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

(S)-2-ciclopropil-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[*f*]imidazo[1,2-*d*][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida que tiene la estructura



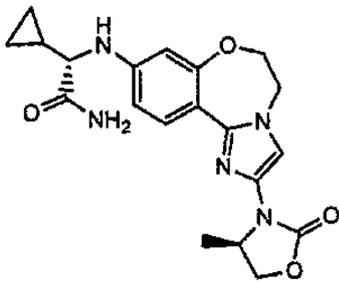
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5

7. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

(S)-2-ciclopropil-2-((2-((R)-4-metil-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida que tiene la estructura

10



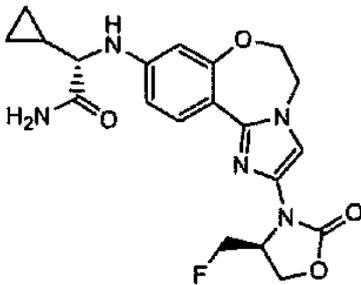
o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

8. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

(S)-2-ciclopropil-2-((2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)acetamida que tiene la estructura

20

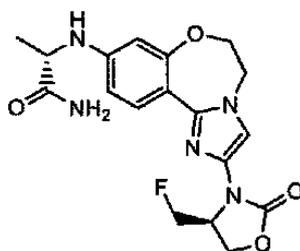


o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

25

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

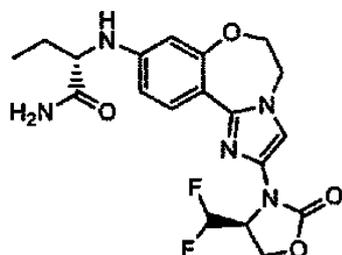
(S)-2-((2-((S)-4-(fluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)propanamida que tiene la estructura



o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 10. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la Fórmula I es:

(S)-2-((2-((S)-4-(difluorometil)-2-oxooxazolidin-3-il)-5,6-dihidrobenzo[f]imidazo[1,2-d][1,4]oxazepin-9-il)amino)butanamida que tiene la estructura



10

o sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 15 11. Una composición farmacéutica compuesta de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo, fluidificante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el vehículo, fluidificante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable se selecciona de dióxido de silicio, celulosa en polvo, celulosa microcristalina, estearatos metálicos, aluminosilicato de sodio, benzoato de sodio, carbonato de calcio, silicato de calcio, almidón de maíz, carbonato de magnesio, talco libre de asbesto, stearowet C, almidón, almidón 1500, laurilsulfato de magnesio, óxido de magnesio y combinaciones de los mismos.

25 13. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica que comprende combinar un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 con un vehículo, fluidificante, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

14. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso para tratar el cáncer en un paciente, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama y carcinoma de pulmón no microcítico.

30 15. El compuesto para su uso de la reivindicación 14 que comprende además administrar al paciente un agente terapéutico adicional seleccionado de 5-FU, docetaxel, eribulina, gemcitabina, cobimetinib, ipatasertib, paclitaxel, tamoxifeno, fulvestrant, GDC-0810, dexametasona, palbociclib, bevacizumab, pertuzumab, trastuzumab emtansina, trastuzumab y letrozol.

35 16. El compuesto para su uso de la reivindicación 14, en el que el cáncer es cáncer de mama.

17. El compuesto para su uso de la reivindicación 16, en el que el cáncer de mama es cáncer de mama con expresión de receptores estrogénicos (RE+).

40 18. El compuesto para su uso de la reivindicación 16, en el que el subtipo de cáncer de mama es basal o luminal.

19. El compuesto para su uso de la reivindicación 14, en el que el cáncer expresa un PIK3CA mutante seleccionado de E542K, E545K, Q546R, H1047L y H1047R.

45 20. El compuesto para su uso de la reivindicación 14, en el que el cáncer expresa un PTEN mutante.

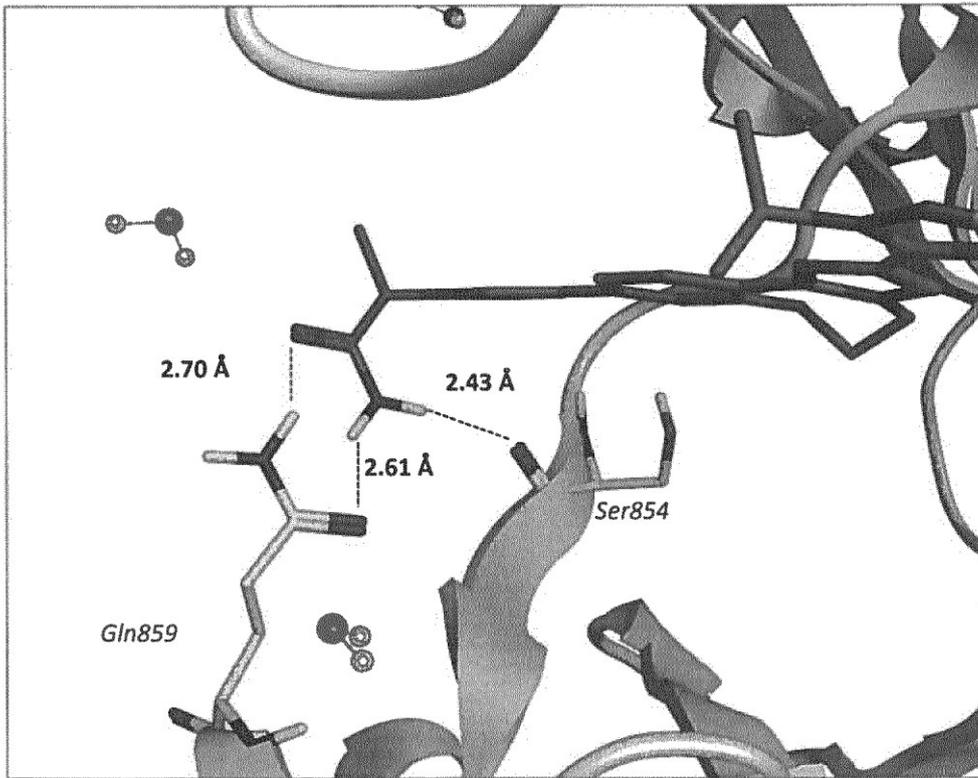
21. El compuesto para su uso de la reivindicación 16, en el que el cáncer es con expresión de HER2.

22. El compuesto para su uso de la reivindicación 16, en el que el paciente no expresa HER2, no expresa ER

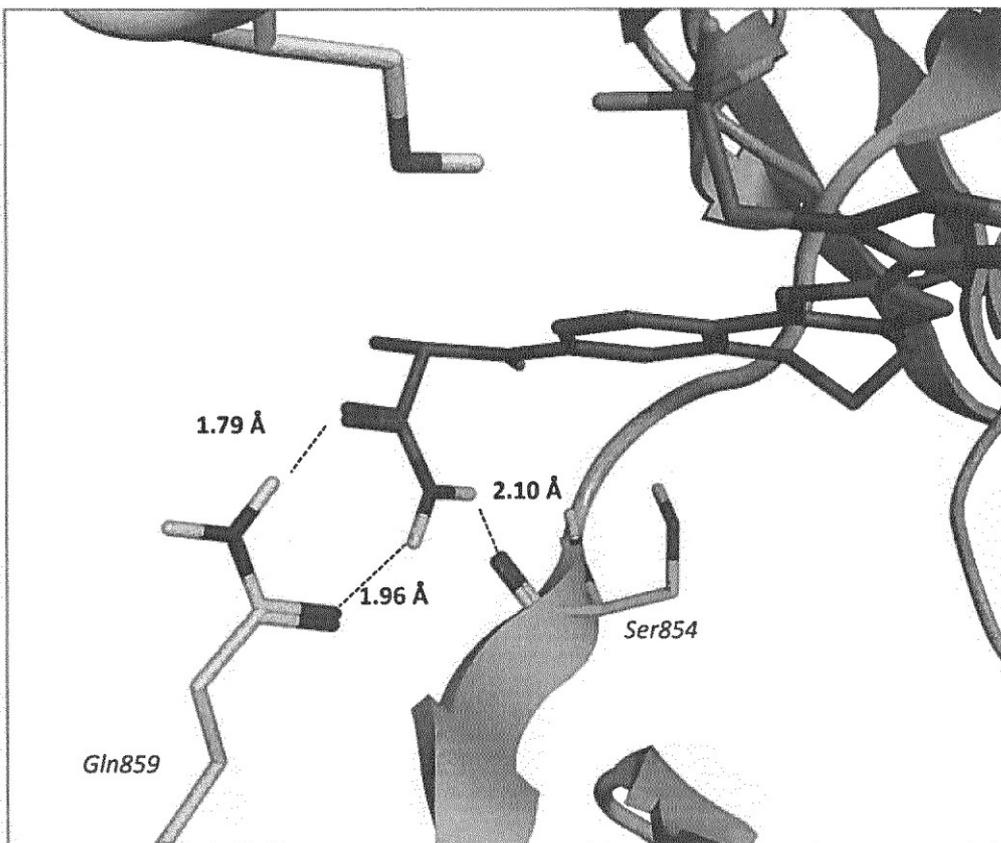
(receptor de estrógeno) y no expresa RP (receptor de progesterona).

23. Un kit para el tratamiento terapéutico del cáncer de mama, que comprende:

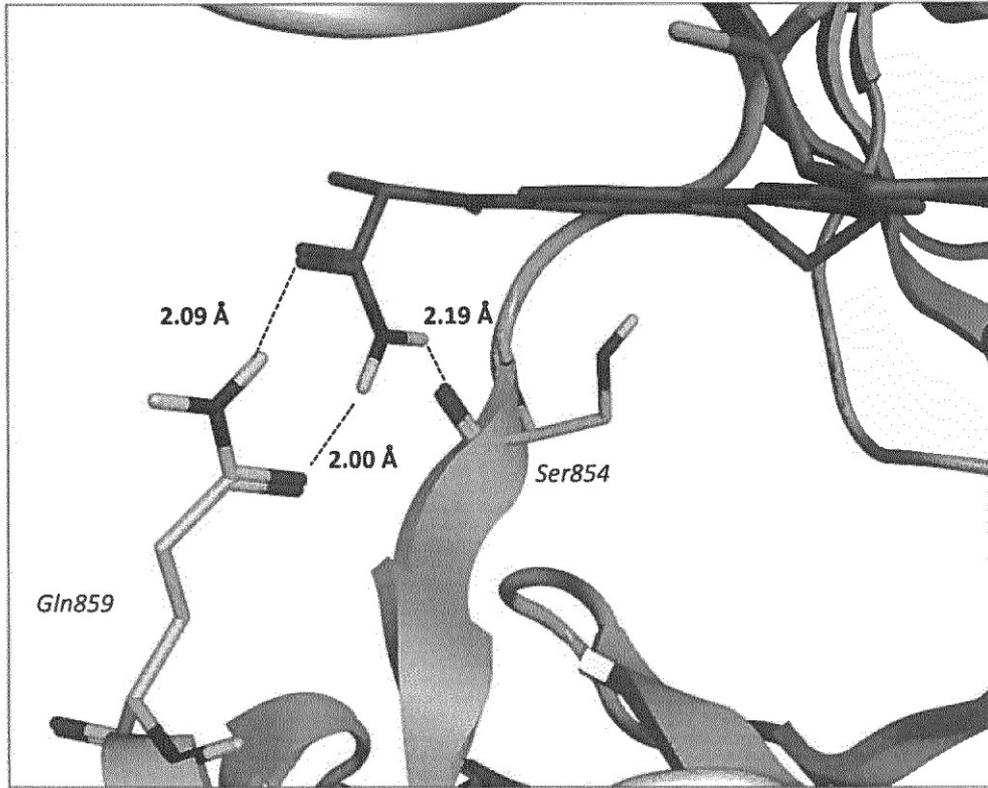
- 5 a) la composición farmacéutica de las reivindicaciones 11 o 12; y
- b) instrucciones de uso en el tratamiento terapéutico del cáncer de mama.



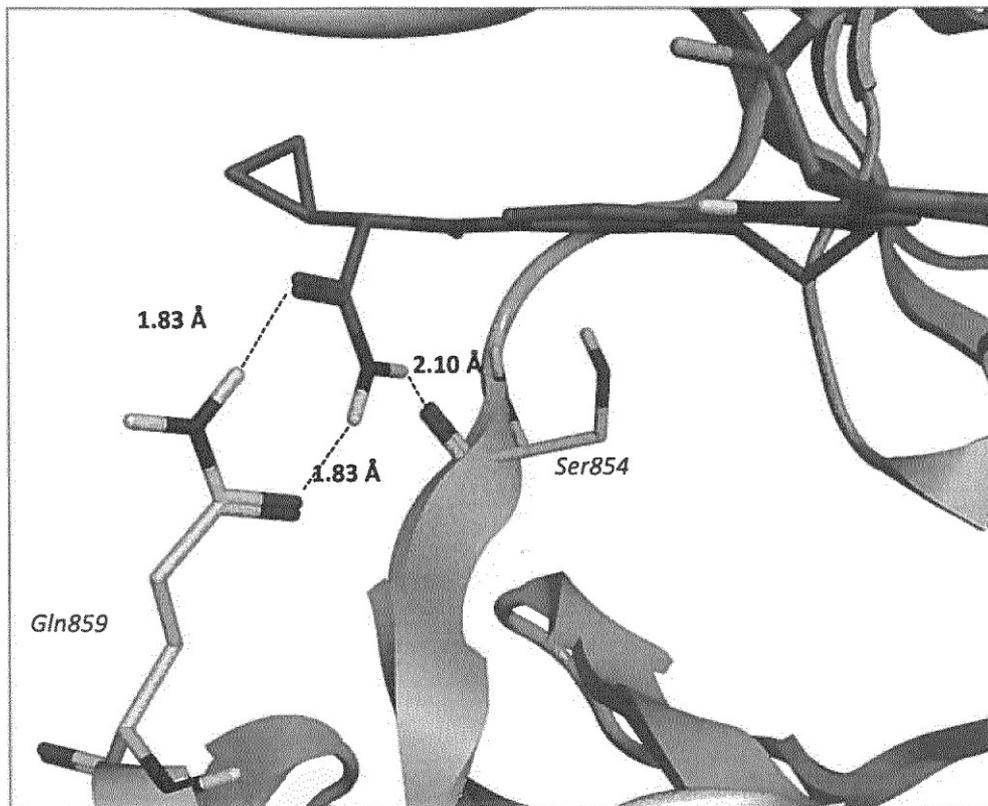
*Fig. 1A*



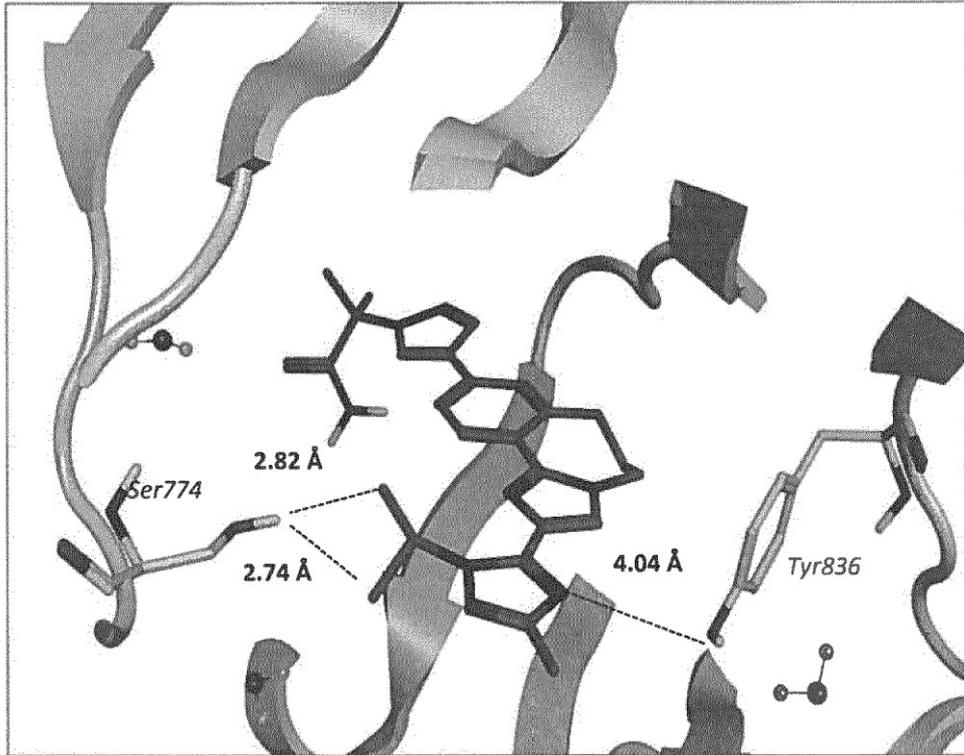
*Fig. 1B*



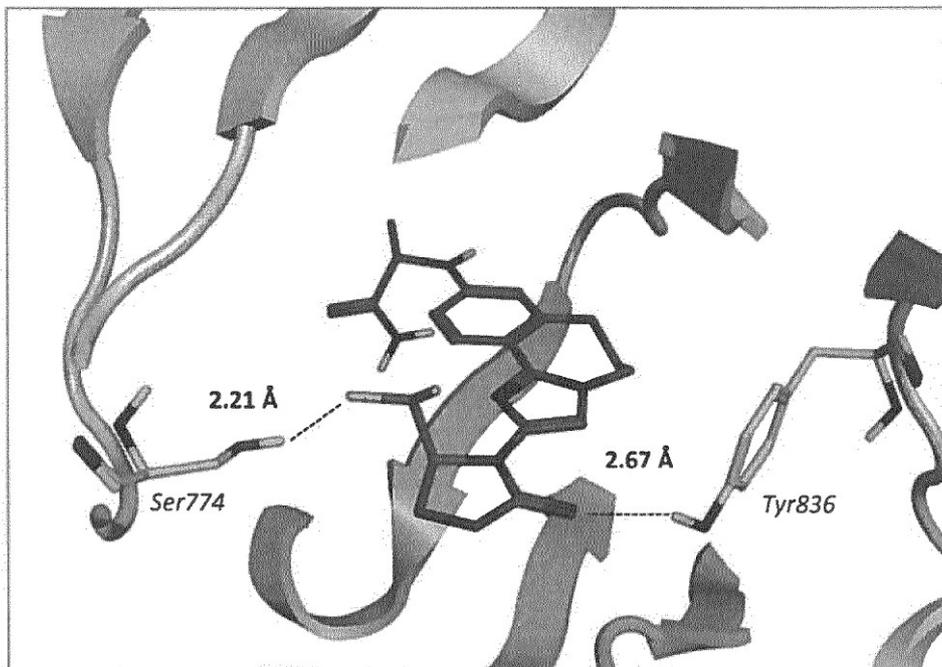
*Fig. 1C*



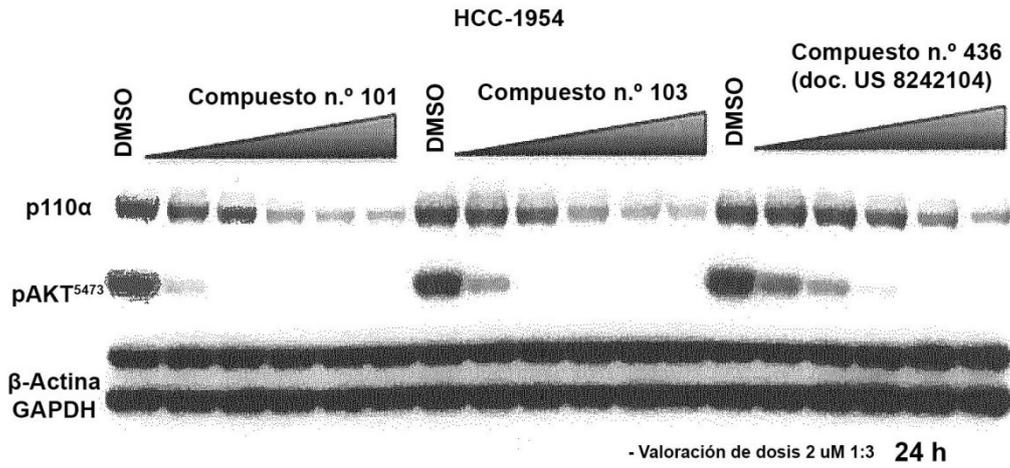
*Fig. 1D*



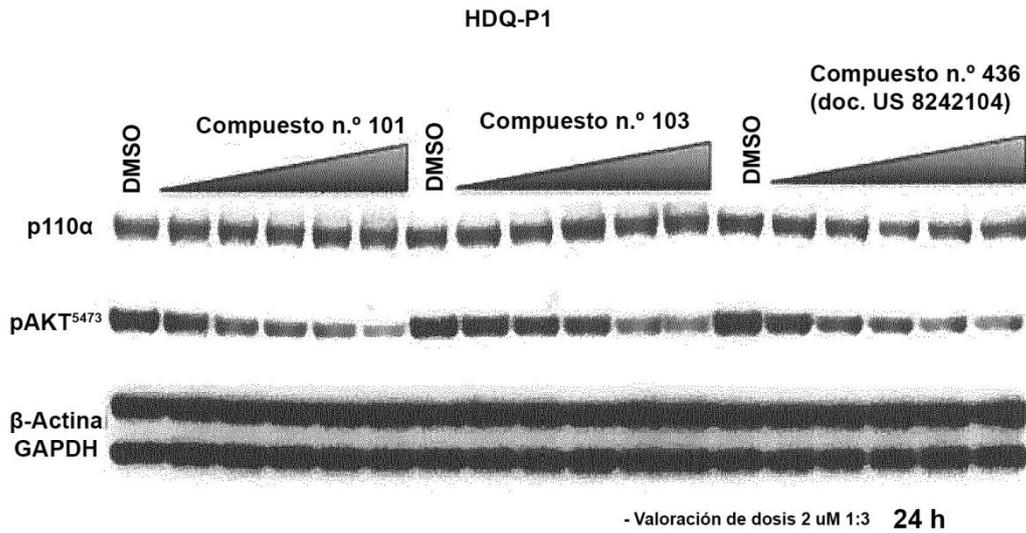
*Fig. 2A*



*Fig. 2B*



*Fig. 3A*



*Fig. 3B*