



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 517**

51 Int. Cl.:
C07D 403/06 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04769673 .7**
86 Fecha de presentación : **19.10.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1682532**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.07.2006**

54 Título: **Pirimidinas como inhibidores de fosfoinositida-3-cinasas (PI3K).**

30 Prioridad: **31.10.2003 US 516591 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **Warner-Lambert Company L.L.C.**
235 East 42nd Street
New York, New York 10017, US

72 Inventor/es: **Connolly, Michael Kevin;**
Gogliotti, Rocco Dean;
Plummer, Mark Stephen y
Visnick, Melean

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Pirimidinas como inhibidores de fosfoinositida-3-cinasas (PI3K).

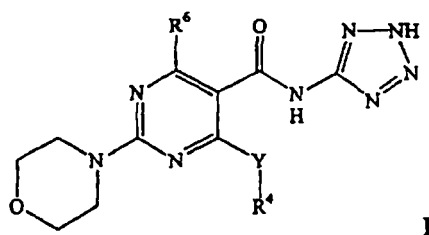
Las fosfoinositida-3-cinasas (PI3Ks) son una familia de cinasas lípidas que fosforilan los fosfoinositoles en el OH 3' para ge

Las fosfoinositida-3-cinasas (PI3Ks) son una familia de cinasas lípidas que fosforilan los fosfoinositoles en el OH 3' para generar PI-3-P (fosfatidilinositol 3-fosfato), PI-3,4-P2 y PI-3,4,5-P3. Una clase de PI3Ks son estimuladas por los factores de crecimiento. Una clase separada de PI3Ks son activadas por receptores acoplados a proteínas G e incluyen la PI3K γ . Las PI3Ks estimuladas por factores de crecimiento (p. ej., PI3K α), han sido implicadas en la proliferación celular y el cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que la PI3K γ está involucrada en cascadas de señales. Por ejemplo, la PI3K γ se activa en respuesta a ligandos tales como C5a, fMLP, ADP, y IL-8. Además, la PI3K γ ha sido implicada en enfermedades inmunes (Hirsch *et al.* Science 2000;287:1049-1053). Los macrófagos nulos de la PI3K γ muestran una respuesta quimiotáctica reducida y una capacidad reducida para luchar contra la inflamación (Hirsch *et al.*, 2000, arriba). Además, la PI3K γ también ha sido implicada en enfermedades trombolíticas (p. ej., tromboembolismo, enfermedades isquémicas, ataques al corazón y apoplejías) (Hirsch *et al.* FASEB J. 2000;15 (11):2019-2021; y Hirsch *et al.* FASEB J., 9 de julio de 2001;10.1096/fj.00-0810fje (citado en la presente memoria como Hirsch *et al.*, 2001).

Se están desarrollando inhibidores de miembros de las PI3Ks para el tratamiento de enfermedades en seres humanos (véanse, p. ej., las solicitudes de patente internacional WO 01/81346; WO 01/53266; y WO 01/83456). Hay una necesidad de compuestos adicionales que puedan inhibir las PI3Ks para su uso como agentes farmacéuticos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona pirimidinas de fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables;

en la que:

R⁶ es hidrógeno o metilo;

Y es O, NH, ó S;

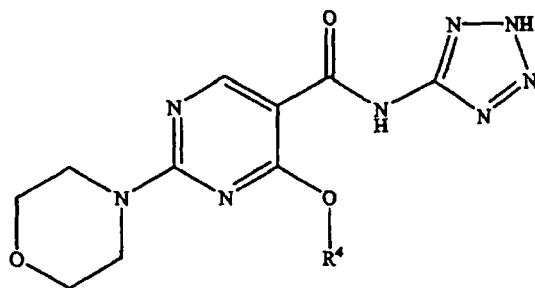
R⁴ se selecciona del grupo que consiste en: un alquilo C₂-C₆, un -L-cicloalquilo C₃-C₈, un adamantilo, un hetero-cicloalquilo de 5 ó 6 miembros, y -J-R^c;

en la que R^c es un grupo fenilo o un grupo naftilo,

en la que L está ausente o es un alquilenos C₁-C₃, y

en la que J está ausente o es un alquilenos C₁-C₄.

En ciertas realizaciones de la Fórmula I, Y es O, R⁶ es hidrógeno, y R⁴ es un cicloalquilo C₃-C₈ - un compuesto de la Fórmula II:

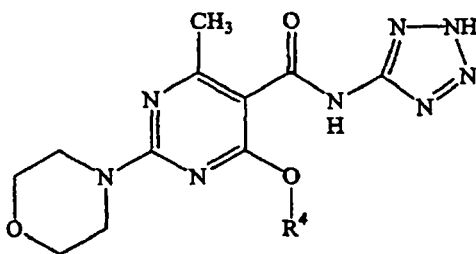


II.

Los ejemplos de un compuesto de la Fórmula II incluyen, pero no están limitados a:

- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclooctiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2-ciclohexil-etoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilmetoxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,3-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y
- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

En ciertas realizaciones de la Fórmula I, Y es O, R⁶ es metilo, y R⁴ es un cicloalquilo C₃-C₈ - un compuesto de la Fórmula III:

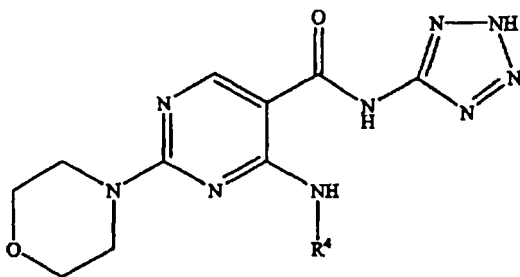


III.

Un ejemplo de un compuesto de la Fórmula III es:

- (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-6-metil-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

En ciertas realizaciones de la Fórmula I, Y es NH, y R⁶ es hidrógeno - un compuesto de la Fórmula IV:



IV.

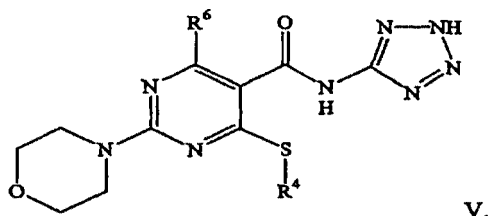
Los ejemplos de un compuesto de la Fórmula IV incluyen, pero no están limitados a:

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-bencilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

En ciertas realizaciones de la Fórmula I, Y es S -un compuesto de la Fórmula V:



Un ejemplo de un compuesto de la Fórmula V es:

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptilsulfanil-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las Fórmulas I-V y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones son útiles en el tratamiento de un trastorno o dolencia mediado por PI3K. Los compuestos de la invención también pueden ser combinados en una composición farmacéutica que también comprenda compuestos que sean útiles para el tratamiento del cáncer, una enfermedad trombolítica, enfermedad del corazón, apoplejía, una enfermedad inflamatoria tal como artritis reumatoide, u otro trastorno mediado por PI3K.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de tratar a un paciente que padece de un trastorno o dolencia mediado por PI3K, que comprende:

administrar, a un paciente que padece un trastorno o dolencia mediado por PI3K, una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las Fórmulas I-V y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la dolencia o trastorno mediado por PI3K se selecciona del grupo que consiste en: artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes. En otras realizaciones, la dolencia o trastorno mediado por PI3K se selecciona del grupo que consiste en: enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, apoplejía, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolismo, embolismo pulmonar, enfermedades trombolíticas, isquemia arterial aguda, oclusiones trombóticas periféricas, y enfermedad de la arteria coronaria. En aún otras realizaciones, la dolencia o trastorno mediado por PI3K se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, cáncer de colon, glioblastoma, carcinoma endometrial, cáncer hepatocelular, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma de tiroides, linfoma celular, trastornos linfoproliferativos, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células escamosas, glioma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, y leucemia. En aún otra realización, la dolencia o trastorno mediado por PI3K se selecciona del grupo que consiste en: diabetes de tipo II. En aún otras realizaciones, la dolencia o trastorno mediado por PI3K se selecciona del grupo que consiste en: enfermedades respiratorias, bronquitis, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En ciertas realizaciones, el paciente es un ser humano.

Definiciones

Tal como se usan en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se especifique lo contrario.

Un “trastorno o dolencia mediado por PI3K” se caracteriza por la participación de una o más PI3Ks o una fosfatasa PI3P, (p. ej., PTEN, etc.) en el comienzo, manifestación de uno o más síntomas o señales de enfermedad, gravedad, o progresión de un trastorno o dolencia. Los trastornos y dolencias mediados por PI3K incluyen, pero no están limitados a: artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, fibrosis pulmonar, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, trombosis venosa profunda, apoplejía, infarto de miocardio, angina inestable, tromboembolismo, embolismo pulmonar, enfermedades trombolíticas, isquemia arterial aguda, oclusiones trombóticas periféricas, enfermedad de la arteria coronaria, cáncer, cáncer de mama, glioblastoma, carcinoma endometrial, carcinoma hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma, carcinoma de células renales, carcinoma de tiroides, cáncer de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células escamosas, glioma, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, leucemia, linfoma celular, trastornos linfoproliferativos, diabetes de tipo II, enfermedades respiratorias, bronquitis, asma, y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Una PI3K es una enzima que es capaz de fosforilar el OH 3' de un fosfoinositol para generar PI3P. Las PI3Ks incluyen, pero no se limitan a, PI3K α , PI3K β , PI3K γ , y PI3K δ . Una PI3K comprende típicamente al menos una subunidad catalítica (p. ej., p110 γ), y puede comprender además una subunidad regulatoria (p. ej., p101, etc.).

La expresión “grupo alquilo” o el término “alquilo” incluye radicales de cadena carbonada lineal y ramificada. El término “alquilenilo” se refiere a un di-radical de un alcano sustituido o sin sustituir. Por ejemplo, un “alquilo C₂₋₆” es un grupo alquilo que tiene de 2 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo C₂-C₆ de cadena lineal incluyen, pero no están limitados a, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, y n-hexilo. Los ejemplos de grupos alquilo de cadena ramificada incluyen, pero sin limitarse a ellos, isopropilo, *tert*-butilo, isobutilo, etc. Los ejemplos de grupos alquilenilo incluyen, pero sin limitarse a ellos, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH(CH₃)-CH₂-, y -(CH₂)₁₋₃. Los grupos alquilenilo pueden estar sustituidos con los grupos expuestos más adelante para el alquilo.

El término alquilo incluye tanto “alquilos sin sustituir” como “alquilos sustituidos”, los últimos de los cuales se refieren a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno sobre uno o más carbonos de la cadena principal hidrocarbonada. Dichos sustituyentes se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: halo, I, Br, Cl, F, -OH, -COOH, trifluorometilo, -NH₂, -OCF₃, y O-alquilo C₁-C₃.

Los grupos alquilo sustituidos típicos, así, son 2,3-dicloropentilo, 3-hidroxi-5-carboxihexilo, 2-aminopropilo; pentaclorobutilo, trifluorometilo, metoxietilo, 3-hidroxipentilo, 4-clorobutilo, 1,2-dimetil-propilo, y pentafluoroetilo.

“Halógeno” incluye flúor, cloro, bromo, y yodo.

El término “cicloalquilo C₃-C₈” se refiere a un grupo cicloalquilo que contiene de 3 a 8 átomos de carbono. Así, el término cicloalquilo C₃-C₈ engloba grupos cicloalquilo monocíclicos que contienen de 3 a 8 átomos de carbono y grupos cicloalquilo bicíclicos que contienen 7 u 8 átomos de carbono. Los ejemplos de “cicloalquilos C₃-C₈” incluyen, pero no están limitados a, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, y biciclo[2.2.1]heptilo; el grupo cicloalquilo puede contener opcionalmente 1 ó 2 dobles enlaces (es decir, un cicloalquilenilo) incluyendo, pero no limitado a, ciclopentenilo, ciclohexenilo y cicloheptenilo. Un “cicloalquilo C₃-C₈” puede estar sustituido con 1 ó 2 grupos seleccionados independientemente entre alquilo C₁-C₃ (p. ej., metilo) y -O-alquilo C₁-C₃ (p. ej., metoxi). Los ejemplos de grupos cicloalquilo sustituidos incluyen, pero no están limitados a, metil-ciclopropilo, dimetil-ciclohexilo, 2-metil-ciclohexilo, 3-metil-ciclohexilo, 3,5-dimetil-ciclohexilo, y 4-metil-ciclohexilo.

El término “adamantilo” incluye adamantilo sin sustituir y adamantilos sustituidos con 1 ó 2 grupos seleccionados independientemente entre alquilo C₁-C₃ (p. ej., metilo) y -O-alquilo C₁-C₃ (p. ej., metoxi).

La frase “heterocicloalquilo de 5 ó 6 miembros” significa un grupo cíclico estable que tiene átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre S, N ó O, en el que cuando dos átomos de O ó un átomo de O y un átomo de S están presentes, los dos átomos de O ó un átomo de O y un átomo de S no están unidos el uno al otro, respectivamente. Opcionalmente, un heterocicloalquilo de 5 ó 6 miembros puede contener 1 ó 2 dobles enlaces carbono-carbono o carbono-nitrógeno. Los ejemplos ilustrativos de heterocicloalquilo de 5 ó 6 miembros incluyen tetrahidrofuran-3-ilo, morfolin-4-ilo; tetrahidro-tiopiran-4-ilo, piperidinilo, tetrahidropiranilo, y 4-metil-piperazin-2-ilo.

A menos que se indique lo contrario, los heterocicloalquilos precedentes pueden estar unidos a través de C o unidos a través de N donde ello sea posible y que dé como resultado la creación de una estructura estable. Por ejemplo, piperidinilo puede ser piperidin-1-ilo (unido a través de N) o piperidin-4-ilo (unido a través de C).

Dentro del término “heterocicloalquilo de 5 ó 6 miembros” están englobados anillos de 5 miembros que tienen un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en el anillo (p. ej., 2-pirrolinilo, 3-pirrolinilo, etc.) y anillos de 6 miembros que tienen un doble enlace carbono-carbono o un doble enlace carbono-nitrógeno en el anillo (p. ej., dihidro-2H-piranilo, 1,2,3,4-tetrahidropiridina, 3,4-dihidro-2H-[1,4]oxazina, etc.).

Un “heterocicloalquilo de 5 miembros” es un anillo cicloalquílico monocíclico estable de 5 miembros que tiene de 2 a 4 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en: 1 O; 1 S; 1 N; 2 N; 3 N; 1 S y 1 N; 1 S y 2 N; 1 O y 1 N; y 1 O y 2 N. Los ejemplos ilustrativos de heterocicloalquilos estables de 5 miembros incluyen tetrahidrofuranilo, dihidrofuranilo, tetrahidrotienilo, dihidrotienilo, imidazolidinilo, oxazolidinilo, imidazolinilo, isoxazolidinilo, pirrolidinilo, 2-pirrolinilo, y 3-pirrolinilo.

Un “heterocicloalquilo de 6 miembros” es un anillo cicloalquílico monocíclico estable de 6 miembros que tiene de 3 a 5 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en: 1 O; 2 O; 1 S; 2 S; 1 N; 2 N; 3 N; 1 S, 1 O, y 1 N; 1 S y 1 N; 1 S y 2 N; 1 S y 1 O; 1 S y 2 O; 1 O y 1 N; y 1 O y 2 N. Los ejemplos ilustrativos de heterocicloalquilos estables de 6 miembros incluyen tetrahidropiranilo, dihidropiranilo, dioxanilo, 1,3-dioxolanilo, 1,4-ditianilo, hexahidropirimidina, morfolinilo, piperazinilo, piperidinilo, 2H-piranilo, 4H-piranilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, 1,2,3,6-tetrahidropiridinilo, tetrahidrotiopiranilo, 1,1-dioxo-hexahidro-1 λ^6 -tiopiranilo, 1,1-dioxo-1 λ^6 -tiomorfolinilo, tiomorfolinilo, tiofanilo, y tritianoilo.

El término “heterocicloalquilo de 5 a 6 miembros” incluye “heterocicloalquilos de 5 ó 6 miembros” saturados e insaturados. Los “heterocicloalquilos de 5 ó 6-miembros” pueden estar sustituidos tal como los expuestos anteriormente para cicloalquilos C₃-C₈, donde sea posible.

El término “fenilo” se refiere a grupos fenilos sin sustituir o sustituidos. Un grupo fenilo puede estar sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: alquilo C₁-C₃, -O-alquilo C₁-C₃, -OCF₃, halo, y un cicloalquilo C₅-C₆.

Los grupos fenilo sustituidos típicos incluyen, pero no están limitados a, 3-clorofenilo, 2,6-dibromofenilo, 2,4,6-tribromofenilo, 2,6-diclorofenilo, 4-trifluorometilfenilo, 3-metil-fenilo, 4-metil-fenilo, 3,5-dimetil-fenilo, 3,4,5-trimetoxi-fenilo, 3,5-dimetoxi-fenilo, 3,4-dimetoxi-fenilo, 3-metoxi-fenilo, 4-metoxi-fenilo, 3,5-difluoro-fenilo, 4-clorofenilo, 3-trifluorometil-fenilo, 3,5-dicloro-fenilo, 2-metoxi-5-metil-fenilo, 2-fluoro-5-metil-fenilo, 4-cloro-2-trifluorometil-fenilo, y similares.

Un “grupo naftilo” se refiere a grupos naftilo sin sustituir y sustituidos. Un grupo naftilo puede estar sustituido con de 1 a 4 sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: alquilo C₁-C₃, -O-alquilo C₁-C₃, -OCF₃, halo, y un cicloalquilo C₅-C₆.

Algunos de los compuestos en la presente invención pueden existir como estereoisómeros, que incluyen enantiómeros, diastereómeros, e isómeros geométricos. Los isómeros geométricos incluyen compuestos de la presente invención que tienen grupos alqueno, que pueden existir como conformaciones *entgegen* o *zusammen*, en cuyo caso todas sus formas geométricas, tanto *entgegen* como *zusammen*, *cis* y *trans*, y sus mezclas, están dentro del alcance de la presente invención. Algunos compuestos de la presente invención tienen grupos cicloalquilo, que pueden estar sustituidos en más de un átomo de carbono, en cuyo caso todas sus formas geométricas, tanto *cis* como *trans*, y sus mezclas, están dentro del alcance de la presente invención. Todas estas formas, incluyendo (R), (S), epímeros, diastereómeros, *cis*, *trans*, *syn*, *anti*, (E), (Z), tautómeros, y sus mezclas, están contempladas en los compuestos de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

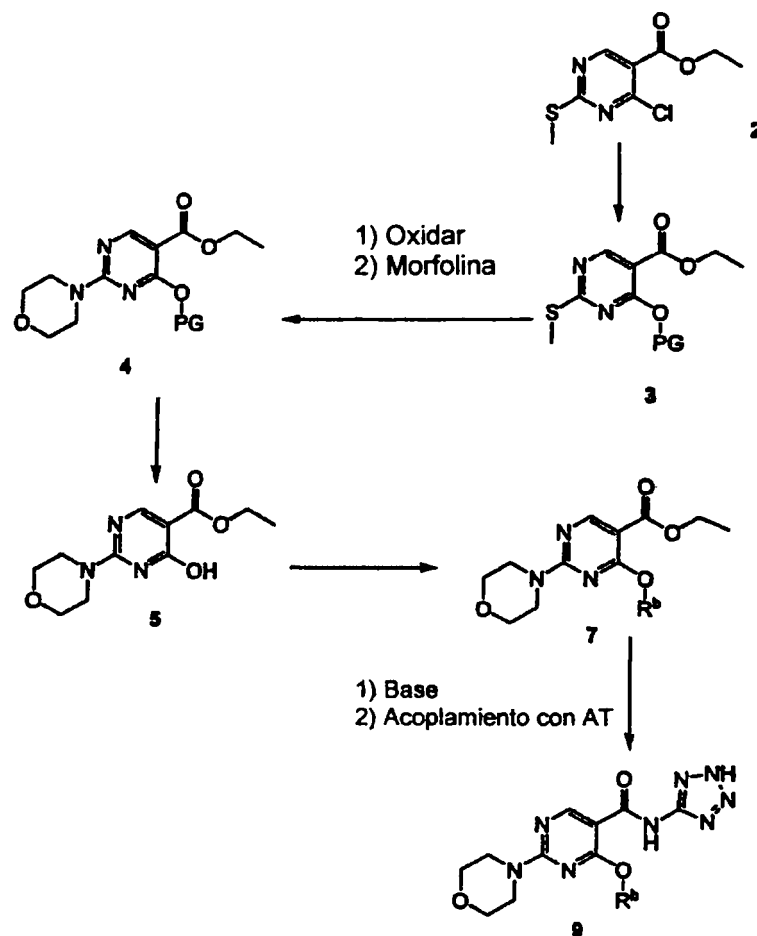
La presente invención se refiere a las pirimidinas de las Fórmulas I-V, en las que R⁴, R⁶, e Y tienen cualquiera de los valores definidos para ellas en la memoria descriptiva, y sus sales farmacéuticamente aceptables, que son útiles como agentes en el tratamiento de enfermedades y dolencias que incluyen enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares y cánceres. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos de las Fórmulas I-V.

II. Preparación de los compuestos

Los compuestos de la presente invención (p. ej., los compuestos de las Fórmulas I-V) se pueden preparar aplicando la metodología sintética conocida en la técnica y la metodología sintética perfilada en los esquemas expuestos más adelante.

(Esquema pasa a página siguiente)

Esquema 1



En el Esquema 1, se hace reaccionar 2 (éster etílico del ácido 4-cloro-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico; Sigma-Aldrich Co.) con un reactivo protector del grupo hidroxilo adecuado, PG (p. ej., (4-nitro-fenil)-metanol) para proporcionar 3 (p. ej., éster etílico del ácido 2-metilsulfanil-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico). Los expertos en la técnica reconocerán que se puede usar una amplia variedad de grupos protectores en el Esquema 1 como grupo protector adecuado para un grupo hidroxilo (véase, p. ej., Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª ed., Capítulo 2 (John Wiley & Sons, Inc., 1991)). Por ejemplo, se puede hacer reaccionar 2 con un alcohol bencilico sustituido o sin sustituir (p. ej. 4-nitro-fenil)-metanol) tratado con un alquil-litio (p. ej., sec-butil-litio, n-butil-litio) en un disolvente tal como THF (tetrahydrofurano) para proporcionar 3 (p. ej., éster etílico del ácido 2-metilsulfanil-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico).

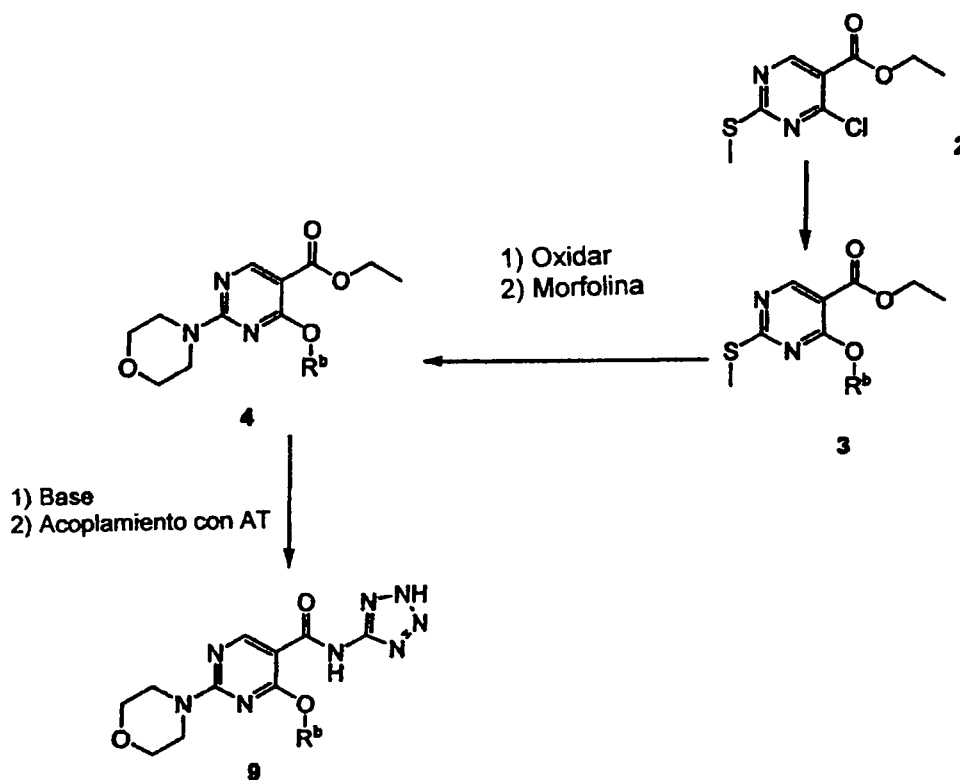
El grupo metil-tio de 3 es oxidado después al derivado de metilsulfinilo correspondiente usando una oxaziridina adecuada (p. ej., la oxaziridina de Davis ((1S)-(+)-(10-camforsulfonil)oxaziridina); 6 3-fenil-2-(fenilsulfonil)-1,2-oxaziridina, etc.), dimetildioxirano, o mCPBA (ácido 3-cloroperoxibenzoico) en un disolvente tal como cloroformo o diclorometano. El grupo metilsulfinilo es desplazado después con morfolina para dar 4 (p. ej., éster etílico del ácido 2-morfolin-4-il-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico).

El grupo protector del hidroxilo en 4 es retirado después para proporcionar 5 (p. ej., éster etílico del ácido 4-cloro-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). Por ejemplo, un grupo nitro-benciloxi puede ser escindido para proporcionar un hidroxilo mediante reducción con un catalizador de paladio/carbón en un disolvente alcohólico tal como etanol, bajo gas hidrógeno a una presión adecuada. En ciertas realizaciones, si el grupo protector es un grupo fenilo o un grupo naftilo opcionalmente sustituido de R⁴, el grupo protector no se retira. 4 se trata entonces con una base y se hace reaccionar con aminotetrazol, como se describe más adelante, para proporcionar 9.

Se hace reaccionar 5 con R^b-OH (p. ej., cicloheptanol) en una reacción de Mitsunobu con DEAD (azodicarboxilato de dietilo) y PPh₃ (trifenilfosfina) en un disolvente tal como tetrahydrofurano (THF) para proporcionar 7 (p. ej., éster etílico del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). R^b-OH es un compuesto que incluye, pero no está limitado a, un compuesto de fórmula HO-L-cicloalquilo C₃-C₈ (donde L está ausente o presente), biciclo[2.2.1] heptanol, adamantanol, en la que L está ausente o es un alquileo C₁-C₃. Los ejemplos de R^b-OH incluyen, pero no están limitados a, ciclohexil-metanol, ciclohexanol, fenil-metanol, cicloheptanol, y ciclooctanol.

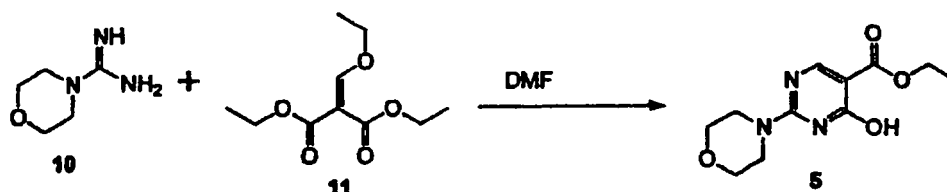
7 es saponificado después con una base inorgánica (p. ej., LiOH, NaOH, etc.) en MeOH y THF; dioxano; dioxano y agua; o metanol y agua, para proporcionar el ácido carboxílico correspondiente 8 (p. ej., ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). El ácido carboxílico es acoplado después con 5-aminotetrazol usando carbodiimidazol (CDI) en un disolvente no prótico tal como THF (tetrahydrofurano) para proporcionar la carboxamida 9 (p. ej., (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). Alternativamente, se puede tratar el 8 en CH₂Cl₂ anhidro con una cantidad catalítica de DMF seguido de cloruro de oxalilo. Se añade entonces 5-aminotetrazol y trietilamina a esta mezcla, seguido de la adición de acetonitrilo para dar 9.

Esquema 2



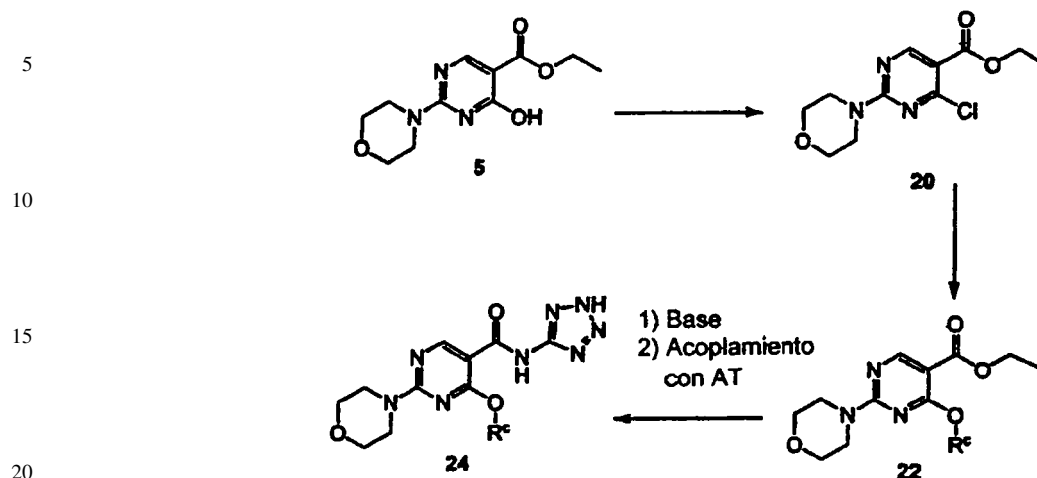
En el Esquema 2, se hace reaccionar 2 con un compuesto R^b-OH que ha sido tratado con un reactivo de alquil-litio tal como n-butil-litio o una base de hidruro (p. ej., NaH) en THF anhidro para producir 3. Después, 3 se oxida y se hace reaccionar con morfolina como en el Esquema 1 para dar 4. 4, por su parte, se hace reaccionar con aminotetrazol como en el Esquema 1, para proporcionar 9.

Esquema 3



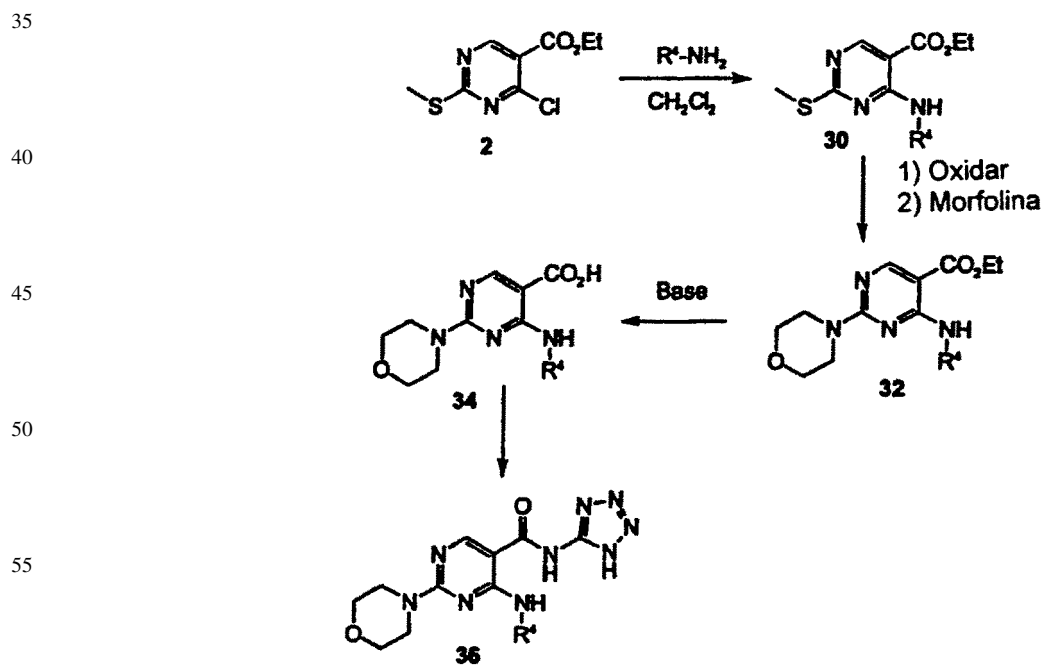
En el Esquema 3, se hace reaccionar 10 (morfolina-4-carboxamida) con 11 (éster dietílico del ácido 2-etoximetileno-malónico) y acetato de sodio en DMF para proporcionar 5 (éster etílico del ácido 4-hidroxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico).

Esquema 4



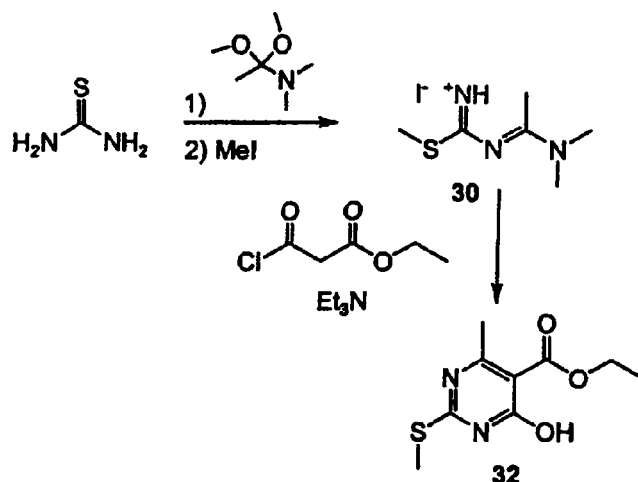
En el Esquema 4, se hace reaccionar 5 en diclorometano con cloruro de oxalilo y una cantidad catalítica de DMF (dimetilformamida) para dar 20 (p. ej., éster etílico del ácido 4-cloro-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). Se hace reaccionar 20 con alcohol (R^c -OH) o tiol (R^d -SH) tratado con una base de hidruro (p. ej., NaH) para proporcionar 22 (p. ej., éster etílico del ácido 2-morfolin-4-il-4-fenoxi-pirimidina-5-carboxílico). R^c -OH es un compuesto que incluye, pero no está limitado a, un compuesto de fórmula HO-L- R^d (donde L está presente, y R^d es un grupo fenilo o naftilo opcionalmente sustituido). Los ejemplos de R^c -OH incluyen, pero no están limitados a, 4-ciclohexilfenol y 4-isopropilfenol. Se trata después 22 con una base y se hace reaccionar con amino-tetrazol como en el Esquema 1 para proporcionar 24.

Esquema 5



En el Esquema 5, se hace reaccionar 2 en diclorometano o cloruro de metileno con una amina básica tal como trietilamina, seguido de R^4 -NH₂ (p. ej., ciclopentilamina, bencilamina, ciclohexilamina, etc.) para dar 30 (p. ej., éster etílico del ácido 4-ciclopentilamino-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico). 30 se oxida después y se hace reaccionar con morfolina como en el Esquema 1 para generar 32 (p. ej., éster etílico del ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico). Se saponifica después 32 para producir 34 (p. ej., ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico), que se acopla después a 5-amino-tetrazol como se describe en el Esquema 1 para dar 36 (p. ej., (1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico).

Esquema 6



En el Esquema 6, se hace reaccionar tiourea en diclorometano anhidro con dimetilacetal de la N,N-dimetilacetamida bajo gas nitrógeno. El producto de la reacción se deja formar, se resuspende en THF anhidro y se hace reaccionar con MeI bajo gas nitrógeno para proporcionar 30 (hidroioduro de 1-[1-(dimetilamino)etiliden]-2-metilisotiurea). Se hace reaccionar después 30 bajo gas nitrógeno con cloruro de malonilo en diclorometano o cloroformo anhidros, con la posterior adición de una base tal como trietilamina para proporcionar 32 (4-hidroxi-6-metil-2-(metiltio)-5-pirimidinacarboxilato de etilo). Se pueden llevar a cabo síntesis que usan 32 como material de partida, de una manera análoga a las descritas anteriormente en los Esquemas 1-5, para proporcionar compuestos de la presente invención donde R^6 es un metilo.

III. Evaluación de los compuestos

Se puede ensayar la capacidad de los compuestos de la presente invención (p. ej., los compuestos de las Fórmulas I-V y sus sales farmacéuticamente aceptables) para inhibir una PI3K. Los ejemplos de estos ensayos se indican más adelante, e incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo* de la actividad de la PI3K.

En ciertas realizaciones de la presente invención, hay compuestos que inhiben de manera selectiva una o más PI3Ks, comparado con una o más enzimas que incluyen, pero no están limitadas a, una proteincinasa dependiente de nucleótidos cíclicos, PDGF, una tirosincinasa, una cinasa MAP, una cinasa cinasa MAP, un MEKK, una proteincinasa dependiente de ciclinas. En otras realizaciones de la invención, hay compuestos que inhiben de manera selectiva una PI3K comparado con otra PI3K. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención muestran la capacidad de inhibir de manera selectiva la PI3K γ , comparado con la PI3K α o PI3K β . Un compuesto inhibe de manera selectiva una primera enzima, comparado con una segunda enzima, cuando la CI_{50} del compuesto hacia la primera enzima es menor que la CI_{50} del compuesto hacia el segundo compuesto. La CI_{50} se puede medir, por ejemplo, en un ensayo de PI3K *in vitro*.

En las realizaciones preferidas actualmente, los compuestos de la presente invención se pueden evaluar en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad de PI3K en un ensayo *in vitro* o *in vivo* (véase más adelante).

Los ensayos de PI3K se llevan a cabo en presencia o ausencia de un compuesto inhibitorio de la PI3K, y se compara la cantidad de actividad enzimática para una determinación de la actividad inhibitoria del compuesto inhibitorio de la PI3K.

A las muestras que no contienen un compuesto inhibitorio de la PI3K se les asigna un valor relativo de actividad de PI3K de 100. La inhibición de la actividad de la PI3K se consigue cuando la actividad de la PI3K en presencia de un compuesto inhibitorio de la PI3K es menor que la muestra de control (es decir, sin compuesto inhibitorio). La CI_{50} de un compuesto es la concentración de compuesto que exhibe el 50% de la actividad de la muestra de control. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen una CI_{50} menor que aproximadamente $100\ \mu\text{M}$. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen una CI_{50} de aproximadamente $1\ \mu\text{M}$ o menos. En aún ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen una CI_{50} de aproximadamente $200\ \text{nM}$ o menos.

Se han descrito ensayos de PI3K γ en la técnica (véase p. ej., Leopoldt *et al.* J. Biol. Chem., 1998; 273: 7024-7029). Típicamente, una muestra que contiene un complejo de proteína p101 y p110 γ se combina con proteínas G β y G γ (p. ej., subunidades β_1/γ_2 de la proteína G). Se añade después ATP radiomarcado (p. ej., $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$) a esta mezcla. Los sustratos lípidos se forman creando micelas lípidas que contienen PIP_2 . Las reacciones son iniciadas entonces añadiendo las mezclas lípidas y enzimáticas, y son detenidas con la adición de H_3PO_4 . Los productos lípidos son transferidos después a una placa de filtro de fibra de vidrio, y lavados con H_3PO_4 varias veces. La presencia de producto lípido radioactivo (PIP_3) se puede medir usando métodos radiométricos que son bien conocidos en la técnica.

La actividad de las PI3Ks reguladas por factores de crecimiento también se puede medir usando un ensayo de cinasa lípida. Por ejemplo, la PI3K α se puede ensayar usando muestras que contienen una subunidad regulatoria y una subunidad catalítica. Se añade un péptido activador (p. ej., péptido pY, SynPep Corp.) a la muestra con ATP radiomarcado. Se añaden después micelas lípidas que contienen PIP₂ a la muestra para iniciar la reacción. Las reacciones son desarrolladas y analizadas como se describe para el ensayo de PI3K γ que se acaba de describir. Los ensayos también se pueden llevar a cabo usando extractos celulares (Susa *et al.* J. Biol. Chem., 1992;267:22951-22956).

IV. Evaluación *in vivo* de los compuestos

Se puede ensayar la capacidad de los compuestos de la presente invención (p. ej., los compuestos de las Fórmulas I-V y sus sales farmacéuticamente aceptables) para disminuir marcadores cuantitativos o cualitativos de procesos tales como la inflamación. Se describen a continuación ejemplos de modelos animales de artritis que pueden usarse para ensayar la capacidad de un compuesto de la presente invención para tratar la artritis reumatoide.

Ensayo de artritis inducida por la pared celular estreptocócica (SCW)

Se induce la artritis como describen Schwab, *et al.*, (1991) *Infection and Immunity* 59:4436-4442, con modificaciones menores. Las ratas reciben 6 μ g de SCW sonicada (en 10 μ l de PBS de Dulbecco (DPBS)) mediante una inyección intraarticular en la articulación tibiotarso derecha en el día 0. En el día 21, se puede iniciar una reacción de hipersensibilidad de tipo retardado por SCW sistémica con 100 g de SCW (250 l) administrada por vía intravenosa. Para estudios de compuestos orales, se pueden suspender los compuestos en un vehículo apropiado (p. ej., hidroxipropil-metilcelulosa 0,5%/Tween 80 0,2%), sonicarse, y administrarse dos veces al día (volumen 10 ml/kg) comenzando 1 hora antes del inicio de la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado por inyección intravenosa de SCW. Los compuestos se administran típicamente en cantidades de entre 10 y 500 mg/kg de peso corporal/día, tal como 20, 30, 60, 100, 200, y 300 mg/kg/día. Las mediciones del edema se obtienen determinando los volúmenes de línea de base de la pata trasera sensibilizada antes de la reactivación en el día 21, y comparándolos con los volúmenes en puntos de tiempo posteriores tales como el día 22, 23, 24, y 25. La pletismografía de desplazamiento de mercurio es un método que se puede usar para ensayar el volumen de la pata de un animal.

Para medir el dolor, las ratas se colocan en un dispositivo que mide la cantidad de presión puesta en cada pata trasera. La diferencia media entre las patas artríticas y las normales es un método usado para medir el dolor. Además, se pueden medir los niveles de citocinas inflamatorias en material que ha sido extraído de las articulaciones artríticas de un animal y compararse con los niveles de una articulación no artrítica o los niveles típicos de articulaciones no artríticas.

Ensayo de artritis inducida por colágeno

La artritis inducida por colágeno (CIA) de tipo II en ratones es un modelo experimental de artritis reumatoide (véase, p. ej., Stuart *et al.* (1984) *Annual Rev. Immunol.* 2: 199-218; Wooley (1988) *Meth. Enzymol.* 162: 361-373). La enfermedad es inducida típicamente por inmunización de ratones DBA/1 con 100 g de colágeno de tipo II ("CII") (p. ej., colágeno de tipo II bovino o de pollito), suministrado por vía intradérmica en la base de la cola, en adyuvante completo de Freund.

Se desarrolla una artritis progresiva e inflamatoria en la mayoría de los ratones inmunizados, caracterizada por aumentos en la anchura de las patas de hasta 100%. Se puede administrar un compuesto de ensayo a los ratones en un intervalo de cantidades, tales como 20, 60, 100, y 200 mg/kg de peso corporal/día. La duración del ensayo puede ser de varias semanas a unos pocos meses, tal como 40, 60, u 80 días. Se puede usar un índice clínico de puntuación para evaluar la progresión de la enfermedad, desde eritema y edema (fase 1), distorsión de la articulación (fase 2), hasta anquilosis de la articulación (fase 3). La enfermedad puede afectar a una o a todas las patas de un animal, dando como resultado una puntuación posible total de 12 para cada ratón. La histopatología de una articulación artrítica revela, de manera general, sinovitis, formación de pannus, y erosiones del cartílago y el hueso. Todos los linajes de ratones que son susceptibles a CIA tienen una alta capacidad para responder con anticuerpos al colágeno de tipo II, y hay una notable respuesta celular al CII.

La dosificación de un compuesto de ensayo se realiza usualmente bien profilácticamente (durante 10 semanas) o bien terapéuticamente (durante 10 días cuando se observa la enfermedad por primera vez). Típicamente, se examina diariamente el desarrollo de la artritis en los ratones y se asigna a menudo una puntuación clínica. También se puede recuperar suero de cada animal en varios puntos de tiempo para la medida de anticuerpos o citocinas (según se requiera). Al final del estudio, se puede aplicar la eutanasia a los ratones y asignarse una puntuación cuantitativa de histopatología.

Ensayo de artritis inducida por anticuerpos monoclonales

Otro modelo experimental de artritis reumatoide implica inyectar anticuerpos para epitopos del colágeno de tipo II en un ratón, para inducir artritis a los pocos días (véase p. ej., Burkhardt *et al.* (2002) *Arthritis & Rheumatism* 46: 2339-2348; Terato *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148: 2103-2108). Están disponibles comercialmente cócteles de cuatro anticuerpos para su uso en este modelo (Arthrogen-CIA[®] Monoclonal Antibody Cocktail, CHEMICON International, Inc., Temecula, CA). Este modelo no requiere ratones de linaje DBA/1. Se puede administrar un compuesto de ensayo a los ratones una o más veces en un intervalo de cantidades, tales como 20, 60, 100, y 200 mg/kg de peso corporal/día

en cualquier momento durante el estudio. Típicamente, la hinchazón del tobillo y la pata se miden cuantitativa o cualitativamente como puntos finales, así como su histología. Además, se puede recuperar suero de cada animal en varios puntos de tiempo para la medida de anticuerpos o citocinas.

5 V. Sales y solvatos farmacéuticamente aceptables

Los compuestos que se usan en la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas, incluyendo las formas hidratadas, son equivalentes a las formas no solvatadas y se pretende que estén englobadas dentro del alcance de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención (p. ej., los compuestos de las Fórmulas I-V) son capaces de formar además sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen, pero no están limitadas a, sales de adición ácida y/o sales básicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la fórmula (I) incluyen las sales de adición ácida y sales básicas (incluyendo disales) de los mismos. Ejemplos de sales adecuadas se pueden encontrar por ejemplo en Stahl y Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany (2002); y Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *J. of Pharmaceutical Science*, 1977;66:1-19.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables de los compuestos de las Fórmulas I-V incluyen sales no tóxicas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos, tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos alcanodioicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, etc. Tales sales incluyen por tanto las sales acetato, aspartato, benzoato, besilato (bencenosulfonato), bicarbonato/carbonato, bisulfato, caprilato, camsilato (canfor-sulfonato), clorobenzoato, citrato, edisilato (1,2-etano-disulfonato), dihidrógenofosfato, dinitrobenzoato, esilato (etano-sulfonato), fumarato, gluceptato, gluconato, glucuronato, hibenzoato, hidrocloreto/cloruro, hidrobromuro/bromuro, hidroyoduro/yoduro, isobutirato, monohidrógenofosfato, isetionato, D-lactato, L-lactato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato (metanosulfonato), metafosfato, metilbenzoato, metilsulfato, 2-napsilato (2-naftalen-sulfonato), nicotinato, nitrato, orotato, oxalato, palmoato, fenilacetato, fosfato, ftalato, propionato, pirofosfato, piro-sulfato, sacarato, sebacato, estearato, suberato, succinato, sulfato, sulfito, D-tartrato, L-tartrato, tosilato (tolueno-sulfonato), y xinafoato, y similares de los compuestos de las Fórmulas I-V. También se contemplan las sales de aminoácidos tales como arginato, gluconato, galacturonato, y similares.

Las sales de adición ácida de los compuestos básicos se preparan poniendo en contacto la forma de base libre con una cantidad suficiente del ácido deseado para producir la sal de manera convencional. La forma de base libre puede regenerarse poniendo en contacto la forma salina con una base y aislando la base libre de la manera convencional. Las formas de base libre difieren algo de sus respectivas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivas bases libres para los fines de la presente invención.

Las sales de adición básica farmacéuticamente aceptables están formadas con metales o aminas, tales como hidróxidos de metales alcalinos y alcalinotérreos, o de aminas orgánicas. Los ejemplos de metales usados como cationes son aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio, y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen arginina, colina, cloroprocaina, N,N'-dibenciletilendiamina, dietilamina, dietanolamina, diolamina, etilendiamina (etano-1,2-diamina), glicina, lisina, meglumina, N-metilglucamina, olamina, procaina (benzatina), y trometamina.

Las sales de adición básica de los compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma ácida libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal de la manera convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma salina con un ácido y aislando el ácido libre de una manera convencional. Las formas de ácido libre difieren algo de sus respectivas formas salinas en ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivos ácidos libres para los fines de la presente invención.

VI. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración

Esta invención proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de las Fórmulas I-V, o una sal cuya farmacéuticamente aceptable, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable para ellas. La frase "composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para administración en el uso médico o veterinario. La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un compuesto, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, suficiente para inhibir, detener, o permitir una mejoría en el trastorno o dolencia que se está tratando cuando se administra solo o conjuntamente con otro agente farmacéutico o tratamiento en un paciente particular o población de pacientes. Por ejemplo, en un ser humano u otro mamífero, se puede determinar experimentalmente una cantidad terapéuticamente eficaz en un ajuste clínico o de laboratorio, o puede ser la cantidad requerida por las directrices de la United States Food and Drug Administration, o agencia extranjera equivalente, para la enfermedad y el paciente particulares que se traten.

Se debe apreciar que la determinación de formas farmacéuticas apropiadas, cantidades de dosificación, y vías de administración está dentro del nivel de especialización ordinaria en la técnica farmacéutica y médica, y se describe más adelante.

ES 2 285 517 T3

Un compuesto de la presente invención se puede formular como una composición farmacéutica en la forma de un jarabe, un elixir, una suspensión, un polvo, unos gránulos, un comprimido, una cápsula, una pastilla para chupar, una pastilla masticable, una disolución acuosa, una crema, una pomada, una loción, un gel, una emulsión, etc. Preferiblemente, un compuesto de la presente invención causará una disminución en los síntomas o indicios de una enfermedad asociada con un trastorno mediado por PI3K, medida cuantitativa o cualitativamente.

Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser o sólidos o líquidos. Las preparaciones de forma sólida incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios, y gránulos dispersables. Un vehículo sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes aromatizantes, ligantes, conservantes, agentes disgregantes de comprimidos, o un material encapsulante.

En los polvos, el vehículo es un sólido finamente dividido que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En los comprimidos, el componente activo se mezcla con el vehículo que tiene las necesarias propiedades de aglutinación en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseado.

Los polvos y comprimidos contienen de 1% a 95% (peso/peso) del compuesto activo. En ciertas realizaciones, el compuesto activo varía desde 5% a 70% (p/p). Los vehículos adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material de encapsulación como vehículo proporcionando una cápsula en la que el componente activo con o sin otros vehículos, está rodeado por un vehículo, que de este modo está en asociación con él. De manera similar, están incluidos los sellos y comprimidos para chupar. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos, y comprimidos para chupar se pueden usar como formas farmacéuticas sólidas adecuadas para la administración oral.

Para preparar supositorios, primero se funde primero una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa homogéneamente en la misma, por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte entonces en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar, y de este modo solidificar.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones, por ejemplo, soluciones en agua o en agua y propilenglicol. En el caso de inyección parenteral, se pueden formular preparaciones líquidas en disolución acuosa de polietilenglicol.

Las disoluciones acuosas adecuadas para un uso oral se pueden preparar disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, aromas, agentes estabilizantes y espesantes adecuados, según se desee. Las suspensiones acuosas convenientes para uso oral se pueden hacer dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y otros agentes de suspensión bien conocidos.

También están incluidas las preparaciones de forma sólida que tienen la finalidad de convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones de forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen disoluciones, suspensiones, y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizantes, tampones, edulcorantes sintéticos y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

La preparación farmacéutica está preferiblemente en la forma de administración unitaria. En esta forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de la preparación, tal como comprimidos envasados, cápsulas, y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, sello o pastilla para chupar en sí mismos, o puede ser un número apropiado de una cualquiera de estas formas envasadas.

La cantidad del componente activo en una preparación de dosis unitaria puede variarse o ajustarse, por ejemplo, desde 0,1 mg a 1000 mg, preferiblemente desde 1,0 mg a 100 mg, o desde 1% a 95% (peso/peso) de una dosis unitaria, según la aplicación concreta y la potencia del componente activo. La composición también puede contener, si se desea, otros agentes terapéuticos compatibles.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la particular composición a ser administrada, así como por el particular método usado para administrar la composición. Por consiguiente, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Gennaro *et al.* Eds., Lippincott Williams y Wilkins, 2000).

Un compuesto de la presente invención, solo o en combinación con otros componentes adecuados, se puede preparar en formulaciones en aerosol (esto es, que pueden ser "nebulizadas") para ser administradas por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tal como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea, incluyen soluciones de inyección estéril isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor para el que están destinadas, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de esta invención, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. Las formulaciones de los compuestos pueden presentarse en recipientes de una sola dosis o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales. Las soluciones y suspensiones para inyección se pueden preparar a partir de polvos, gránulos, y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. El término “paciente” se refiere a un miembro de la clase de los mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, sin limitación, los seres humanos, primates, chimpancés, roedores, ratones, ratas, conejos, caballos, ganado, perros, gatos, ovejas, y vacas.

La dosis se determinará por la eficacia del compuesto particular empleado y la enfermedad del sujeto, así como por el peso corporal o el área superficial del sujeto a ser tratado. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza, y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañen a la administración de un compuesto particular en un paciente particular. En la determinación de la cantidad eficaz del compuesto para ser administrado en el tratamiento o profilaxis del trastorno que se trata, el médico puede evaluar factores tales como los niveles en plasma circulantes del compuesto, las toxicidades del compuesto, y/o la progresión de la enfermedad, etc. En general, la dosis equivalente de un compuesto es de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a 100 mg/kg para un paciente típico. Los expertos en la técnica conocen muchos métodos diferentes de administración.

Para la administración, los compuestos de la presente invención pueden ser administrados en una frecuencia determinada por factores que pueden incluir, pero no están limitados a, la DL_{50} del compuesto, el perfil farmacocinético del compuesto, los fármacos contraindicados, y los efectos secundarios del compuesto a diversas concentraciones, aplicadas al peso y salud global del paciente. La administración se puede realizar por dosis únicas o divididas.

Los ejemplos de formulación de comprimidos, formulación parenteral, y formulación para parches típicas incluyen lo siguiente:

Ejemplo 1 de formulación para comprimidos

Formulación del comprimido	
Ingrediente	Cantidad
Compuesto de las Fórmulas I-V	50 mg
Lactosa	80 mg
Almidón de maíz (para mezcla)	10 mg
Almidón de maíz (para la pasta)	8 mg
Estearato de magnesio (1%)	2 mg
	150 mg

Los compuestos de la presente invención (p. ej., un compuesto de las Fórmulas I-V, o una sal cuya farmacéuticamente aceptable) se pueden mezclar con la lactosa y el almidón de maíz (para mezclar) hasta uniformidad en un polvo. El almidón de maíz (para la pasta) se suspende en 6 ml de agua y se calienta con agitación para formar una pasta. Se añade la pasta a la mezcla de polvo, y se granula la mezcla. Los gránulos húmedos se pasan a través de un tamiz duro del N° 8 y se secan a 50°C. La mezcla se lubrica con estearato de magnesio al 1% y se comprime para formar un comprimido. Los comprimidos se administran a un paciente a la frecuencia de 1 a 4 cada día para el tratamiento de un trastorno o dolencia mediado por PI3K.

Ejemplo 1 de formulación parenteral en solución

En una disolución de 700 ml de propilenglicol y 200 ml de agua para inyección se pueden añadir 20,0 g de un compuesto de la presente invención. La mezcla se agita y el pH se ajusta a 5,5 con ácido clorhídrico. El volumen se ajusta a 1000 ml con agua para inyección. La disolución se esteriliza, se rellenan con ella ampollas de 5,0 ml, conteniendo cada una 2,0 ml (40 mg del compuesto de la invención), y se sellan bajo una atmósfera de nitrógeno. La disolución se administra por inyección a un paciente que padece un trastorno o dolencia mediado por PI3K y necesitado de tratamiento.

Ejemplo 1 de formulación para parches

Se pueden mezclar 10 miligramos de un compuesto de la presente invención con 1 ml de propilenglicol y 2 mg de un adhesivo de polímero con una base de acrílico que contiene un agente reticulador resinoso. La mezcla se aplica a

un soporte impermeable (30 cm²) y se aplica a la parte superior de la espalda de un paciente para el tratamiento de liberación sostenida de un trastorno o dolencia mediado por PI3K.

VII. Métodos para tratar trastornos y dolencias mediados por PI3K

Los compuestos de la presente invención y las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la presente invención pueden ser administrados a un paciente que padezca un trastorno o dolencia mediado por PI3K. Los trastornos o dolencias mediados por PI3K se pueden tratar de manera profiláctica, de manera aguda, y de manera crónica usando los compuestos de la presente invención, dependiendo de la naturaleza del trastorno o dolencia. Típicamente, el huésped o sujeto en cada uno de estos métodos es un ser humano, aunque también se pueden beneficiar otros mamíferos de la administración de un compuesto de la presente invención.

En las aplicaciones terapéuticas, los compuestos de la presente invención se pueden preparar y administrar en una amplia variedad de formas farmacéuticas orales y parenterales. El término “administrar” se refiere al método de poner en contacto un compuesto con un paciente. Así, los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante inyección, es decir, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal, parenteral, o intraperitoneal. Además, los compuestos descritos en la presente memoria se pueden administrar mediante inhalación, por ejemplo, por vía intranasal. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por vía transdérmica, tópica, y por implantación. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención se administran por vía oral. Los compuestos también se pueden administrar por vía rectal, bucal, intravaginal, ocular, andial, o por insuflación.

Los compuestos utilizados en el método farmacéutico de la invención se pueden administrar a la dosificación inicial de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg/kg al día. En ciertas realizaciones, el intervalo de dosis diaria es de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Sin embargo, las dosificaciones pueden variar, dependiendo de los requerimientos del paciente, la gravedad de la dolencia que se está tratando, y el compuesto que se está empleando. La determinación de la dosis apropiada para una situación particular está dentro de la especialización del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosis pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después, la dosificación es aumentada en incrementos pequeños hasta que se alcanza el efecto óptimo dadas las circunstancias. Por conveniencia, la dosis total diaria se puede dividir y administrar en porciones durante el día, si se desea. El término “tratamiento” incluye la disminución o alivio agudo, crónico o profiláctico de al menos un síntoma o característica asociado con o causado por el trastorno que se está tratando. Por ejemplo, el tratamiento puede incluir la disminución de varios síntomas de un trastorno, la inhibición de la progresión patológica de un trastorno, o la completa erradicación de un trastorno. Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados conjuntamente a un sujeto. El término “administrados conjuntamente” significa la administración de dos o más agentes farmacéuticos o tratamientos (por ejemplo, tratamiento por radiación) diferentes que se administran a un paciente por asociación en la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. Por tanto, la administración conjunta incluye la administración al mismo tiempo de una única composición farmacéutica que comprende dos o más agentes farmacéuticos o la administración de dos o más composiciones diferentes al mismo paciente, al mismo tiempo o a diferentes tiempos. Por ejemplo, a un paciente al que se administra una primera dosificación que comprende un compuesto de la presente invención a las 8 de la mañana y después se le administra CELEBREX® 1-12 horas más tarde, p. ej., a las 6 de la tarde de ese mismo día, se le ha administrado conjuntamente un compuesto de la presente invención y CELEBREX®. Alternativamente, por ejemplo, a un paciente al que se le pudiera administrar una dosificación única que comprendiera un compuesto de la presente invención y CELEBREX® a las 8 de la mañana se le habría administrado conjuntamente un compuesto de la presente invención y CELEBREX®.

Así, los compuestos de la invención también pueden administrarse conjuntamente con compuestos que sean útiles para el tratamiento del cáncer (p. ej., fármacos citotóxicos tales como TAXOL®, taxotere, GLEEVEC® (Imatinib Mesilato), adriamicina, daunomicina, cisplatino, etopósido, un alcaloide de la vinca, vinblastina, vincristina, metotrexato, o adriamicina, daunomicina, cis-platino, etopósido, y alcaloides, tales como vincristina, inhibidores de la farnesiltransferasa, endostatina y angiostatina, inhibidores de VEGF, y antimetabolitos tales como metotrexato. Los compuestos de la presente invención también se pueden usar en combinación con un derivado de taxano, un complejo de coordinación de platino, un análogo de nucleósido, una antraciclina, un inhibidor de la topoisomerasa, o un inhibidor de la aromatasa). También se pueden administrar conjuntamente tratamientos de radiación con un compuesto de la presente invención para el tratamiento de cánceres.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar conjuntamente con compuestos que sean útiles para el tratamiento de una enfermedad trombolítica, enfermedad cardíaca, apoplejía, etc., (p. ej., aspirina, estreptocinasa, activador del plasminógeno tisular, urocinasa, anticoagulantes, fármacos antiplaquetarios (p. ej., PLAVIX®; bisulfato de clopidogrel), una estatina (p. ej., LIPITOR® (Atorvastatina calcio), ZOCOR® (Simvastatina), CRESTOR® (Rosuvastatina), etc.), un Beta-bloqueante (p. ej., Atenolol), NORVASC® (besilato de amlodipina), y un inhibidor de ACE (p. ej., Accupril® (Quinapril Hidrocloruro), Lisinopril, etc.).

Los compuestos de la invención también se pueden administrar conjuntamente para el tratamiento de la hipertensión con compuestos tales como inhibidores de ACE, agentes disminuidores de lípidos tales como estatinas, LIPITOR® (Atorvastatina calcio), bloqueantes de los canales del calcio, tales como NORVASC® (amlodipina besilato). Los compuestos de la presente invención se pueden usar también en combinación con fibratos, beta-bloqueantes, inhibidores de NEPI, antagonistas del receptor 2 de angiotensina e inhibidores de la agregación plaquetaria.

Para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo la artritis reumatoide, los compuestos de la invención se pueden administrar conjuntamente con agentes tales como inhibidores de TNF- α , tales como anticuerpos monoclonales anti-TNF α (tales como REMICADE[®], CDP-870 y HUMIRA[™] (adalimumab) y moléculas de fusión del receptor TNF-inmunoglobulina (tales como ENBREL[®]), inhibidores de IL-1, antagonistas del receptor o IL-1Ra soluble (p. ej. KINERET[™] o inhibidores de ICE), agentes antiinflamatorios no esteroideos (FAINES), piroxicam, diclofenaco, naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno, ibuprofeno, fenamatos, ácido mefenámico, indometacina, sulindaco, apazona, pirazolonas, fenilbutazona, aspirina, inhibidores de COX-2 (tales como CELEBREX[®] (celecoxib), VIOXX[®] (rofecoxib), BEXTRA[®] (valdecoxib) y etoricoxib, inhibidores de metaloproteasas (preferiblemente inhibidores selectivos de MMP-13), NEUROTIN[®], pregabalina, sulfasalazina, metotrexato en dosis bajas, leflunomida, hidroxycloroquina, d-penicilamina, auranofina u oro parenteral u oral.

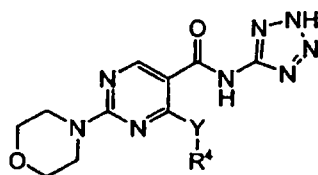
Los compuestos de la invención se pueden administrar conjuntamente con agentes terapéuticos existentes para el tratamiento de la osteoartritis. Los agentes adecuados para ser usados en combinación incluyen agentes antiinflamatorios no esteroideos estándar (en adelante FAINES) tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiónicos tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno y ibuprofeno, fenamatos tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindaco, apazona, pirazolonas tales como fenilbutazona, salicilatos tales como aspirina, inhibidores de COX-2 tales como celecoxib, valdecoxib, rofecoxib y etoricoxib, analgésicos y terapias intraarticulares tales como corticosteroides y ácidos hialurónicos tales como hialgan y synvisc.

Los compuestos de la invención también se pueden administrar conjuntamente con agentes antivirales tales como Viracept, AZT, aciclovir y famciclovir, y compuestos antisepsis tales como Valant.

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar conjuntamente además con agentes para el SNC tales como antidepresivos (tales como sertralina), fármacos anti-Parkinson (tales como deprenilo, L-Dopa, Requip, Mirapex, inhibidores de MAOB tales como selegina y rasagilina, inhibidores de comp tales como Tasmar, inhibidores de A-2, inhibidores de la reabsorción de dopamina, antagonistas de NMDA, agonistas de Nicotina, agonistas de Dopamina e inhibidores de óxido nítrico sintasa neuronal), NEURONTIN[®], pregabalina, y fármacos anti-Alzheimer tales como ARICEPT[®], tacrina, propentofina o metrifonato.

Los compuestos de la presente invención, adicionalmente, se pueden administrar conjuntamente con agentes anti-osteoporosis tales EVISTA[®] (hidrocloruro de raloxifeno), droloxifeno, lasofoxifeno o FOSAMAX[®] y agentes inmunopresores tales como FK-506 y rapamicina.

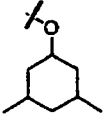
Ejemplos



Ej.	-Y-R ⁴	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μM)
1		389,3	1,50 (m, 6H), 1,65 (m, 2H), 1,85 (m, 2H), 2,01 (m, 2H), 3,65 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,39 (m, 1H), 8,67 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 16,00 (s, 1H). Calculado C-52,57%, H-6,23%, N-28,85%, Cl-0%, H ₂ O-0%. Encontrado C-52,36%, H-6,24%, N-28,72%, Cl-0%, H ₂ O-0%.	0,197
2		361,2	(CDCl ₃) 1,78 (m, 3H), 1,7-2,2 (m, 5H), 3,78 (m, 4H), 3,95 (m, 4H), 5,69 (m, 1H), 8,97 (s, 1H), 10,46 (s, 1H), 13,29 (s, 1H). Calculado C-49,99%, H-5,59%, N-31,09%. Encontrado C-49,97%, H-5,54%, N-30,86%.	1,541
3		335,2	1,38 (d, J=6,34 Hz, 6H), 3,65 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 5,40 (m, 1H), 8,66 (s, 1H), 11,01 (s, 1H), 16,01 (s, 1H).	87,4965
4		375,3	1,44 (m, 4H), 1,66 (m, 4H), 3,65 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,27 (m, 1H), 8,69 (s, 1H), 10,92 (s, 1H), 16,02 (s, 1H)	1,735

ES 2 285 517 T3

Ej.	-Y-R ⁴	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μM)
5		403,3	1,53-1,96 (m, 14H), 3,66 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 5,41 (m, 1H), 8,68 (s, 1H), 10,88 (s, 1H), 16,03 (s, 1H).	0,5025
6		403,2	0,91-1,73 (m, 13H), 3,65 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 4,47 (m, 2H), 8,65 (s, 1H), 10,96 (s, 1H). Calculado C-53,72%, H-6,51%, N-27,84%. Encontrado C-53,56%, H-6,60%, N-27,64%.	10,07
7		389,2	1,05-1,79 (m, 11H), 3,64 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 4,27 (d, J=5,01 Hz, 2H), 8,66 (s, 1H), 11,02 (s, 1H), 16,02 (s, 1H). Calculado C-52,57%, H-6,23%, N-28,85%. Encontrado C-52,21%, H-6,19%, N-29,02%.	1,835
8		351,2	3,32 (s, 3H), 3,65 (m, 4H), 3,71 (m, 2H), 3,81 (m, 4H), 4,56 (m, 2H), 8,69 (s, 1H), 10,95 (s, 1H). Calculado C-44,57%, H-5,18 %, N-31,98%. Encontrado C-44,81%, H-5,02%, N-31,60%.	2,32
9		403,3	0,94 (d, J=7,81 Hz, 6H), 1,30 (m, 3H), 1,46 (m, 2H), 1,67 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 3,66 (m, 4H), 3,79 (m, 4H), 5,30 (m, 1H), 8,66 (s, 1H), 10,96 (s, 1H), 15,97 (s, 1H).	1,36
10		377,3	1,76 (m, 2H), 2,04 (m, 2H), 3,55 (m, 2H), 3,65 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 3,82 (m, 2H), 5,40 (m, 1H), 8,67 (s, 1H), 11,06 (s, 1H), 16,01 (s, 1H). Calculado C-47,87%, H-5,36%, N-29,77%. Encontrado C-47,74%, H-5,34%, N-29,85%.	10,48
11		427,2	1,59-2,21 (m, 14H), 3,64 (m, 4H), 3,77 (m, 4H), 5,38 (m, 1H), 8,70 (s, 1H), 10,95 (s, 1H).	0,485
12		387,2	1,08-2,22 (m, 10H), 3,64 (m, 4H), 3,78 (m, 4H), 5,28 (m, 1H), 8,65 (s, 1H), 10,98 (s, 1H).	0,845
13		363,2	1,01 (s, 9H), 3,65 (m, 4H), 3,80 (m, 4H), 4,15 (s, 2H), 8,67 (s, 1H), 10,96 (s, 1H), 16,03 (s, 1H).	2,06
14		363,2	0,95 (d, J=6,83 Hz, 3H), 0,97 (d, J=6,83 Hz, 3H), 1,30 (d, J=6,34 Hz, 3H), 1,98 (m, 1H), 3,66 (m, 4H), 3,79 (m, 4H), 5,22 (m, 1H), 8,69 (s, 1H), 10,91 (s, 1H), 16,01 (s, 1H).	1,16
15		361,2	0,41 (m, 2H), 0,59 (m, 2H), 1,18 (s, 3H), 3,62-3,65 (m, 4H), 3,78-3,82 (m, 4H), 4,27 (s, 2H), 8,68 (s, 1H), 10,98 (s, 1H), 16,02 (s, 1H). Calculado C-49,99%, H-5,59%, N-31,09%. Encontrado C-49,94%, H-5,50%, N-31,26%.	1,69

Ej.	-Y-R ^a	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μ M)
16		403,3	0,60 (m, 1H), 0,92 (d, J=6,34 Hz, 6H), 1,06 (m, 2H), 1,60 (m, 3H), 2,12 (m, 2H), 3,66 (m, 4H), 3,79 (m, 4H), 5,17 (m, 1H), 8,67 (m, 1H), 10,93 (s, 1H).	0,21

^a MS: M+1 APCI a menos que se indique lo contrario. ^b DMSO, 400 MHz, δ valores reportados.

Intermedio 1

Éster etílico del ácido 2-metilsulfanil-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico

A una disolución agitada de alcohol 4-nitrobencílico (16,7 g, 109 mmol) en THF anhidro (120 mL) a -78°C, se añadió nBuLi (1,6 M en hexanos, 75 mL, 120 mmol) mediante una jeringuilla. Se agitó la reacción a -78°C durante diez minutos y después se retiró el baño frío y se dejó calentar la mezcla hasta la temperatura ambiente. La disolución del alcóxido de nitrobencilo se vertió en una disolución agitada de 4-cloro-2-metiltio-5-pirimidina-carboxilato de etilo (25,0 g, 107,3 mmol) en THF anhidro (120 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se diluyó con H₂O y se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se decantaron, y se concentraron para dar un sólido. El sólido se suspendió en una mínima cantidad de diclorometano y se filtró. El sólido se recogió y se secó durante una noche en el horno de vacío para dar el producto del título deseado (19,4 g, 51,8% de rendimiento), en forma de un sólido. MS: M+1 = 350,1.

Intermedio 2

Éster etílico del ácido 2-metanosulfonil-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico

A una disolución agitada del Intermedio 1 (19,4 g, 55,6 mmol) en cloroformo (185 mL) se añadió mCPBA (13,8 g, 61,2 mmol) por partes. La reacción exotérmica se moderó con un baño de hielo-agua para mantener la temperatura de la reacción próxima a la temperatura ambiente. Se agitó entonces la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 25 minutos. La mezcla se calmó con NaHCO₃ acuoso saturado y se diluyó con agua. La dilución se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado (18,84 g, 92,8% de rendimiento), en forma de un sólido naranja. El producto se utilizó después sin purificación adicional. MS: M+1 = 366,1 (APCI).

Intermedio 3

Éster etílico del ácido 2-morfolin-4-il-4-(4-nitro-benciloxi)-pirimidina-5-carboxílico

Se agitó el Intermedio 2 (35,4 g, 97,0 mmol) en morfolina (16,9 mL) a 100°C durante quince minutos. Se dejó enfriar la reacción hasta la temperatura ambiente y después se diluyó con tolueno (~100 mL). La mezcla de dilución se concentró a vacío. El residuo remanente se hirvió en EtOAc (~300 mL) y después se filtró. Las aguas madres se concentraron a vacío. El sólido remanente se suspendió en una cantidad mínima de diclorometano y se filtró. El sólido se recogió y se secó durante una noche en un horno de vacío para dar el producto del título deseado (12,8 g, 34,0% de rendimiento), en forma de un sólido blanco. MS: M+1 = 389,1 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 8,79 (s, 1H), 8,24 (m, 2H), 7,68 (m, 2H), 5,54 (s, 2H), 4,33 (q, J=7,2 Hz, 2H), 3,99 (m, 2H), 3,85 (m, 2H), 3,74 (m, 2H), 3,23 (m, 2H), 1,36 (t, J=7,2 Hz, 3H).

Intermedio 4

Éster etílico del ácido 4-hidroxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Se agitó el Intermedio 3 (4,00 g, 10,3 mmol) con Pd/C 20% (0,400 g) en etanol (52 mL) a temperatura ambiente bajo un globo de hidrógeno durante 16 horas. Se añadió una porción adicional de Pd/C 20% (0,400 g) y se burbujó hidrógeno a través de la mezcla de reacción durante diez minutos. La reacción se agitó bajo un globo de hidrógeno a temperatura ambiente durante cuatro horas. La mezcla se filtró a través de celite. El precipitado del filtro se aclaró con EtOAc y diclorometano. Las aguas madres se concentraron para dar un sólido. El sólido se suspendió en una cantidad mínima de éter dietílico a temperatura ambiente durante dos horas y después se filtró. El sólido se recogió y se secó durante una noche en un horno de vacío para dar el producto del título deseado (2,49 g, 95,6% de rendimiento), en forma de un sólido de color hueso. MS: M+1 = 254,1 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 8,67 (s, 1H), 4,38 (q, J=7,1 Hz, 2H), 3,93 (m, 4H), 3,74 (m, 4H), 1,39 (t, J=7,1 Hz, 3H).

ES 2 285 517 T3

Intermedio 5

Éster etílico del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

5 El Intermedio 4 (10,00 g, 39,49 mmol) se combinó con cicloheptanol (7,134 mL, 59,23 mmol), DEAD (8,25 g, 47,4 mmol), y trifenilfosfina (12,4 g, 47,4 mmol) en THF (150 mL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. El análisis por HPLC indicó un nuevo producto, junto con un exceso de trifenilfosfina y óxido de trifenilfosfina. La mezcla de reacción se concentró a vacío. El concentrado se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-30% EtOAc-hexanos, TLC en 20% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (10,84 g, 78,57% de rendimiento) en forma de un aceite rosa claro. MS: M+1 = 350,3 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1,33 (t, J=7,20 Hz, 3H), 1,54 (m, 5H), 1,75 (m, 2H), 1,94 (m, 5H), 3,74 (m, 1H), 3,92 (m, 4H), 4,28 (q, J=7,08 Hz, 2H), 5,35 (m, 1H), 8,70 (m, 1H).

Intermedio 6

Ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

20 Se agitó el Intermedio 5 (10,84 g, 31,02 mmol) con dioxano (60 mL) 1y LiOH 1N (40 mL) en un matraz de fondo redondo a 80°C durante dos horas. Se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente y después se acidificó lenta y cuidadosamente con HCl 1N hasta un pH de aproximadamente 1. Precipitó un sólido blanco. Se diluyó la mezcla con más H₂O y después se filtró. El precipitado del filtro se aclaró con H₂O, se recogió, y se secó durante una noche en el horno de vacío para dar el producto del título deseado (5,70 g, 57,2% de rendimiento) en forma de un sólido amarillo claro. MS: M+1 = 322,2 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) ppm 1,4-1,7 (m, 8H), 1,89 (s, 2H), 2,09 (m, 2H), 3,76 (m, 4H), 3,89 (m, 4H), 5,45 (m, 1H), 8,86 (s, 1H).

Ejemplo 1

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

30 Se mezcló el Intermedio 6 (5,70 g, 17,7 mmol) - pero no se disolvió - con diclorometano anhidro (50 mL). Se añadieron aproximadamente cinco gotas de DMF. Se añadió cloruro de oxalilo (1,70 mL, 19,5 mmol) mediante una jeringuilla. La mezcla burbujeó y lentamente se hizo homogénea. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante diez minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó el consumo completo del ácido de partida y la formación de un producto nuevo, menos polar. Se añadieron 5-aminotetrazol (3,17 g, 37,2 mmol), trietilamina (5,19 mL, 37,3 mmol), y finalmente acetonitrilo (50 mL). La reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó un producto nuevo. El recipiente de reacción se abrió y se dejó hervir hasta casi sequedad. Se retiró el baño de aceite y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El alquitrán remanente se recogió en una cantidad mínima de acetonitrilo (15 mL). La mezcla se diluyó con H₂O (100 mL) y se acidificó con HCl 1N hasta que precipitó un sólido blanco lanudo. El sólido se filtró y se aclaró con H₂O. El precipitado se recogió y se suspendió en una cantidad mínima de MeOH durante 30 minutos. La suspensión se filtró y el precipitado se aclaró con una cantidad mínima de MeOH. El sólido se secó durante una noche en una estufa de vacío para dar el producto del título deseado (4,832 g, 70,14% de rendimiento) en forma de cristales aciculares pequeños, de color amarillo claro. Punto de fusión: 287,1°C (determinado en un aparato Buchi Melting Point B-545).

45 Los compuestos de los títulos de los Ejemplos 2-15 se sintetizaron de una manera análoga a la del Ejemplo 1, reemplazando el cicloheptanol por un alcohol apropiado (p. ej. ciclopentanol).

Ejemplo 2

50 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Ejemplo 3

55 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-isopropoxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Ejemplo 4

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

60 *Ejemplo 5*

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclooctiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

65 *Ejemplo 6*

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2-ciclohexil-etoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

ES 2 285 517 T3

Ejemplo 7

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilmetoxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

5 Ejemplo 8

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2-metoxi-etoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Ejemplo 9

10 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,3-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Ejemplo 10

15 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 2-morfolin-4-il-4-(tetrahydro-piran-4-iloxi)-pirimidina-5-carboxílico*

Ejemplo 11

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(adamantan-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

20 Ejemplo 12

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(biciclo[2.2.1]hept-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

25 Ejemplo 13

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2,2-dimetil-propoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Ejemplo 14

30 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(1,2-dimetil-propoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Ejemplo 15

35 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(1-metil-ciclopropilmetoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Intermedio 7

40 *Éster etílico del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico*

A una disolución de 3,5-dimetilciclohexanol (6,18 g, 43,1 mmol) en THF anhidro (100 mL) a -78°C, se añadió nBuLi (1,6M en hexanos, 26,9 mL, 43,1 mmol) mediante una jeringuilla. Se retiró el baño frío y se dejó calentar la reacción hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se vertió después en una disolución agitada de 4-cloro-2-metiltio-5-pirimidina-carboxilato de etilo (10,0 g, 43,1 mmol) en THF anhidro (100 mL). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante dos horas. La mezcla se diluyó con H₂O y se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se decantaron y se concentraron. El concentrado se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-12% EtOAc-hexanos, TLC en 10% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (5,95 g, 42,6% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro. MS: M+1 = 325,3 (APCI).

Intermedio 8

55 *Éster etílico del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-metanosulfinil-pirimidina-5-carboxílico*

A una disolución agitada del Intermedio 7 (5,89 g, 18,2 mmol) en cloroformo (60 mL) se añadió mCPBA (4,90 g, 21,8 mmol) por partes. La reacción exotérmica se moderó con un baño de hielo-agua para mantener la temperatura de la reacción próxima a la temperatura ambiente. Se agitó entonces la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 25 minutos. La mezcla se calmó con NaHCO₃ acuoso saturado y se diluyó con agua. La dilución se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado, en rendimiento cuantitativo. El producto se utilizó después sin purificación adicional. MS: M+1 = 341,1 (APCI).

65

ES 2 285 517 T3

Intermedio 9

Éster etílico del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

- 5 Se agitó el Intermedio 8 (7,13 g, 21,0 mmol) en morfolina (9,14 mL) a 100°C durante una hora. Se dejó enfriar la reacción hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción entera se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-16% EtOAc-hexanos, TLC en 20% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (2,68 g, 35,2% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro. MS: M+1 = 364,7 (APCI).

10 Intermedio 10

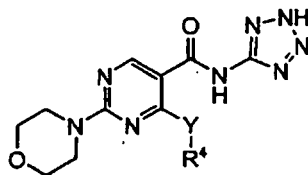
Ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

- 15 Se agitó el Intermedio 9 (2,48 g, 6,83 mmol) con dioxano (19,2 mL) 1y LiOH 1N (12,8 mL) en un matraz de fondo redondo a 80°C durante 90 minutos. Se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente y después se acidificó lenta y cuidadosamente con HCl 1N hasta un pH de aproximadamente 1. Precipitó un sólido blanco. Se diluyó la mezcla con más H₂O y después se filtró. El precipitado del filtro se aclaró con H₂O, se recogió, y se secó durante una noche en la estufa de vacío para dar el producto del título deseado (1,43 g, 62,2% de rendimiento) en forma de un sólido blanco. MS: M+1 = 336,2 (APCI). Microanálisis: Calculado C-60,88%, H-7,51%, N-12,53%. Encontrado C-60,87%, H-7,67%, N-12,24%.

Ejemplo 16

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

- 25 Se mezcló el Intermedio 10 (0,750 g, 2,24 mmol) -pero no se disolvió- con diclorometano anhidro (11 mL). Se añadieron aproximadamente tres gotas de DMF. Se añadió cloruro de oxalilo (0,213 mL, 2,46 mmol) mediante una jeringuilla. La mezcla burbujeó y lentamente se hizo homogénea. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante diez minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó el consumo completo del ácido de partida y la formación de un producto nuevo, menos polar. Se añadieron 5-aminotetrazol (0,400 g, 4,70 mmol), trietilamina (0,654 mL, 4,70 mmol), y finalmente acetonitrilo (11 mL). La reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó un producto nuevo. El recipiente de reacción se abrió y se dejó hervir hasta casi sequedad. Se retiró el baño de aceite y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El alquitrán remanente se recogió en una cantidad mínima de acetonitrilo (15 mL). La mezcla se diluyó con H₂O (100 mL) y se acidificó con HCl 1N hasta que precipitó un sólido blanco lanudo. El sólido se filtró y se aclaró con H₂O. El precipitado se recogió y se suspendió en una cantidad mínima de MeOH durante 30 minutos. La suspensión se filtró y el precipitado se aclaró con una cantidad mínima de MeOH. El sólido se secó durante una noche en una estufa de vacío para dar el producto del título deseado (0,699 g, 77,6% de rendimiento), en forma de un sólido blanco.



Ej.	-Y-R ⁴	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μM)
17		411,3	1,20 (d, J=6,83 Hz, 6H), 2,91 (m, 1H), 3,55 (m, 4H), 3,81 (m, 2H), 7,19 (m, 2H), 7,30 (m, 2H), 8,72 (m, 1H), 11,70 (s, 1H), 16,02 (s, 1H). calculado C-54,68%, H-5,36%, N-28,53%. encontrado C-54,56%, H-5,07%, N-28,44%.	0,805
18		451,3	1,19-1,79 (m, 11H), 3,54 (m, 8H), 7,17 (d, J=8,54 Hz, 2H), 7,27 (d, J=8,54 Hz, 2H), 8,72 (s, 1H), 11,67 (s, 1H), 16,03 (s, 1H).	0,1545

^a MS: M+1 APCI a menos que se indique lo contrario. ^bDMSO, 400 MHz, δ valores reportados.

ES 2 285 517 T3

Intermedio 11

Éster etílico del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico

5 A una disolución agitada de 4-isopropilfenol (5,86 g, 43,1 mmol) en THF anhidro (100 mL) se le añadió hidruro de sodio (1,03 g, 43,1 mmol) lenta y cuidadosamente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La disolución del fenóxido se vertió después en una disolución agitada de 4-cloro-2-tiometil-5-pirimidina-carboxilato de etilo (10,0 g, 43,1 mmol) en THF anhidro (100 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se diluyó con H₂O y se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se decantaron y se concentraron. El concentrado se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-20% EtOAc-hexanos, TLC en 10% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (9,88 g, 69,0% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro. MS: M+1 = 333,5 (APCI).

Intermedio 12

Éster etílico del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-metanosulfinil-pirimidina-5-carboxílico

20 A una disolución agitada del Intermedio 11 (9,03 g, 27,2 mmol) en cloroformo (91 mL) se añadió mCPBA (7,32 g, 32,6 mmol) por partes. La reacción exotérmica se moderó con un baño de hielo-agua para mantener la temperatura de la reacción próxima a la temperatura ambiente. Se agitó entonces la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 25 minutos. La mezcla se calmó con NaHCO₃ acuoso saturado y se diluyó con agua. La dilución se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado en forma de un aceite incoloro, en rendimiento cuantitativo. MS: M+1 = 349,1 (APCI).

Intermedio 13

Éster etílico del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

30 Se agitó el Intermedio 12 (9,82 g, 28,2 mmol) en morfolina (12,3 mL) a 100°C durante una hora. Se dejó enfriar la reacción hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-30% EtOAc-hexanos, TLC en 20% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (2,56 g, 24,4% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro. MS: M+1 = 372,5 (APCI).

Intermedio 14

Ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

40 Se agitó el Intermedio 13 (2,36 g, 6,36 mmol) con dioxano (19,2 mL) y LiOH 1N (12,8 mL) en un matraz de fondo redondo a 80°C durante noventa minutos. Se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente y después se acidificó lenta y cuidadosamente con HCl 1N hasta un pH de aproximadamente 2-3. Precipitó un sólido blanco. Se diluyó la mezcla con más H₂O y después se filtró. El precipitado del filtro se aclaró con H₂O, se recogió, y se secó durante una noche en la estufa de vacío para dar el producto del título deseado (1,81 g, 82,9% de rendimiento) en forma de un sólido blanco. MS: M+1 = 344,2 (APCI). Microanálisis: Calculado C-62,96%, H-6,16%, N-12,24%. Encontrado C-62,95%, H-6,20%, N-12,18%.

Ejemplo 17

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

50 Se mezcló el Intermedio 14 (0,800 g, 2,33 mmol) -pero no se disolvió- con diclorometano anhidro (11 mL). Se añadieron aproximadamente cinco gotas de DMF. Se añadió cloruro de oxalilo (0,222 mL, 2,56 mmol) mediante una jeringuilla. La mezcla burbujeó y lentamente se hizo homogénea. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante diez minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó el consumo completo del ácido de partida y la formación de un producto nuevo, menos polar. Se añadieron 5-aminotetrazol (0,416 g, 4,89 mmol), trietilamina (0,680 mL, 4,89 mmol), y finalmente acetonitrilo (11 mL). La reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó un producto nuevo. El recipiente de reacción se abrió y se dejó hervir hasta casi sequedad. Se retiró el baño de aceite y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El alquitrán remanente se recogió en una cantidad mínima de acetonitrilo (1 mL). La mezcla se diluyó con H₂O (15 mL) y se acidificó con HCl 1N hasta que precipitó un sólido blanco lanudo. El sólido se filtró y se aclaró con H₂O. El precipitado se recogió y se suspendió en una cantidad mínima de MeOH durante 30 minutos. La suspensión se filtró y el precipitado se aclaró con una cantidad mínima de MeOH. El sólido se secó durante una noche en una estufa de vacío para dar el producto del título deseado (0,739 g, 77,4% de rendimiento), en forma de un sólido blanco.

ES 2 285 517 T3

Intermedio 15

Éster etílico del ácido 4-cloro-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

A una disolución a temperatura ambiente del Intermedio 4 (3,46 g, 13,7 mmol) y DMF (~5 gotas) en diclorometano anhidro (70 ml) se añadió cloruro de oxalilo (1,31 mL, 15,0 mmol) gota a gota mediante una jeringuilla. La reacción mostró efervescencia. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante veinte minutos. El análisis por HPLC de una alícuota indicó el consumo completo de la pirimidina de partida y la formación de un producto nuevo, menos polar. La reacción se diluyó con NaHCO₃ acuoso saturado. La dilución se extrajo tres veces con diclorometano. Los extractos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado (1,056 g, 96,5% de rendimiento), en forma de un sólido amarillo claro. MS: M+1 = 272,1 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1,37 (t, J=7,08 Hz, 3H), 3,75 (m, 4H), 3,90 (m, 4H), 4,34 (q, J=7,08 Hz, 2H), 8,81 (s, 1H).

Intermedio 16

Éster etílico del ácido 4-(4-ciclohexil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

A una disolución agitada de 4-ciclohexilfenol (0,290 g, 1,62 mmol) en THF anhidro (5 mL) se le añadió hidruro de sodio (0,040 g, 1,62 mmol) lenta y cuidadosamente. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 minutos. La disolución del fenóxido se vertió después en una disolución agitada del Intermedio 15 (0,440 g, 1,62 mmol) en THF anhidro (5 mL). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La reacción se diluyó con H₂O y se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron. El concentrado se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente en 0-30% EtOAc-hexanos) para dar el producto del título deseado (0,445 g, 66,9% de rendimiento) en forma de un aceite amarillo claro. MS: M+1 = 412,3 (APCI).

Intermedio 17

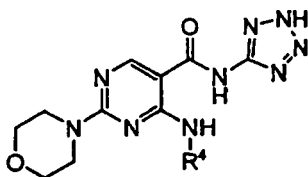
Ácido 4-(4-ciclohexil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Se agitó el Intermedio 16 (0,445 g, 1,08 mmol) con dioxano (3,0 mL) 1y LiOH 1N (2,25 mL) en un matraz de fondo redondo a 80°C durante quince minutos. Se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente y después se acidificó lenta y cuidadosamente con HCl 1N hasta un pH de aproximadamente 2-3. Precipitó un sólido blanco. Se diluyó la mezcla con más H₂O y después se filtró. El precipitado del filtro se aclaró con H₂O, se recogió, y se secó durante una noche en una estufa de vacío para dar el producto del título deseado (0,369 g, 88,9% de rendimiento) en forma de un sólido blanco. MS: M+1 = 384,2 (APCI).

Ejemplo 18

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-ciclohexil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Se mezcló el Intermedio 17 (0,369 g, 0,960 mmol) -pero no se disolvió- con diclorometano anhidro (5 mL). Se añadieron aproximadamente tres gotas de DMF. Se añadió cloruro de oxalilo (0,093 mL, 1,06 mmol) mediante una jeringuilla. La mezcla burbujeó y lentamente se hizo homogénea. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante diez minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó el consumo completo del ácido de partida y la formación de un producto nuevo, menos polar. Se añadieron 5-aminotetrazol (0,204 g, 2,40 mmol), trietilamina (0,330 mL, 2,40 mmol), y finalmente acetonitrilo (5 mL). La reacción se agitó a 80°C durante 60 minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó un producto nuevo. El recipiente de reacción se abrió y se dejó hervir hasta casi sequedad. Se retiró el baño de aceite y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. El alquitrán remanente se recogió en una cantidad mínima de acetonitrilo (1 mL). La mezcla se diluyó con H₂O (15 mL) y se acidificó con HCl 1N hasta que precipitó un sólido blanco lanudo. El sólido se filtró y se aclaró con H₂O. El precipitado se recogió y se suspendió en una cantidad mínima de MeOH durante 30 minutos. La suspensión se filtró y el precipitado se aclaró con una cantidad mínima de MeOH. El sólido se secó durante una noche en una estufa de vacío para dar el producto del título deseado (0,246 g, 56,9% de rendimiento), en forma de un sólido blanco.



Ej.	-R ⁴	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μM)
19		360,3	1,37-1,45 (m, 2H), 1,53-1,70 (m, 4H), 1,96-2,04 (m, 2H), 3,61-3,63 (m, 4H), 3,75-3,78 (m, 4H), 7,28-4,34 (m, 1H), 8,55 (d, J=6,83 Hz), 8,76 (s, 1H)	32,72
20		382,2	3,57-3,60 (m, 4H), 3,73-3,76 (m, 4H), 4,62-4,64 (m, 2H), 7,22-7,30 (m, 1H), 7,30-7,35 (m, 4H), 8,78 (s, 1H), 8,87 (bt, 1H, J=5,61 Hz)	39,09
21		374,2	1,21-1,40 (m, 5H), 1,53-1,56 (m, 1H), 1,65-1,68 (m, 2H), 1,88-1,92 (m, 2H), 3,61-3,63 (m, 4H), 3,68-3,75 (m, 4H), 3,93-3,98 (m, 1H), 8,53 (d, 1H, J=7,3 Hz), 8,76 (s, 1H)	28,59

Intermedio 18

Éster etílico del ácido 4-ciclopentilamino-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico

A una disolución agitada de 4-cloro-2-metiltio-5-pirimidina-carboxilato de etilo (2,00 g, 8,59 mmol) en cloruro de metileno se añadió trietilamina (3,60 mL, 25,8 mmol) seguido de ciclopentilamina (1,0 mL, 10,12 mmol). La disolución de la reacción se calentó a reflujo durante 45 min. El análisis por HPLC de una alícuota indicó el consumo completo de la pirimidina de partida y la formación de un nuevo producto. La reacción se vertió en HCl 1M y se diluyó con cloruro de metileno. La capa orgánica se lavó con agua, salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró hasta un sólido beige. (2,3614 g, 97%).

Intermedio 19

Éster etílico del ácido 4-ciclopentilamino-2-metanosulfinil-pirimidina-5-carboxílico

El Intermedio 19 se preparó de una manera similar a la del Intermedio 8 usando el Intermedio 18 (2,36 g, 8,39 mmol) y mCPBA (2,14 mL, 1,14 mmol) para proporcionar un aceite amarillo pálido (2,456 g, 98%).

Intermedio 20

Éster etílico del ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

El Intermedio 20 se preparó de una manera similar a la del Intermedio 9 usando el Intermedio 19 (2,45 g, 8,24 mmol) y morfolina (20 mL, 229,3 mmol) para proporcionar un sólido de color hueso en bruto. Éste se purificó por cromatografía en gel de sílice (25% éter/hexanos) para proporcionar un sólido blanco lanudo (2,52 g, 95%).

Intermedio 21

Ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

El Intermedio 21 se preparó de una manera similar a la del Intermedio 10 usando el Intermedio 20 (0,971 g, 3,03 mmol) y 6,2 mL de LiOH 1M para proporcionar un sólido blanco (0,700 g, 79%).

Ejemplo 19

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

El Ejemplo 19 se preparó de una manera similar a la del Ejemplo 15 usando el Intermedio 21 (0,129 g, 0,441 mmol) para proporcionar el producto del título en forma de un sólido blanco (0,125 g, 79%). MS: M+1= 360,3 (APCI). ¹H-NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 1,37-1,45 (m, 2H), 1,53-1,70 (m, 4H), 1,96-2,04 (m, 2H), 3,61-3,63 (m, 4H), 3,75-3,78 (m, 4H), 7,28-4,34 (m, 1H), 8,55 (d, J=6,83 Hz), 8,76 (s, 1H).

ES 2 285 517 T3

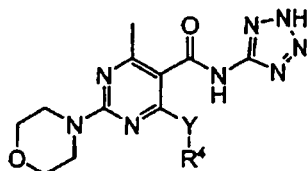
Los compuestos de los títulos de los Ejemplos 20 y 21 se sintetizaron de una manera análoga a la del Ejemplo 19 reemplazando la ciclopentilamina por bencilamina o ciclohexilamina, respectivamente.

Ejemplo 20

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-bencilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Ejemplo 21

(1H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilamino-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico



Ej.	-Y-R ⁴	MS ^a	NMR ^b y/o análisis de combustión	CI50 (μM)
22		403,2	1,48 (m, 8H), 1,71 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 2,26 (s, 3H), 3,63 (m, 4H), 3,71 (m, 4H), 5,20 (m, 1H), 11,86 (s, 1H).	8,435

^a MS: M+1 APCI a menos que se indique lo contrario. ^b DMSO, 400 MHz, δ valores reportados.

Intermedio 22

Hidrioduro de 1-[1-(dimetilamino)etiliden]-2-metilisotiurea

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, de 5 L, dotado de un agitador en cabeza, condensador de reflujo, entrada de nitrógeno y camisa calefactora se cargó con tiourea (162,8 g, 2,14 mol) y diclorometano anhidro (2,4 L). Se añadió dimetilacetato de la N,N-dimetilacetamida (399,9 g, 3 mol, 1,4 eq.) al matraz. La mezcla de reacción se calentó a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante dos horas y después se retiró del calor y se concentró a sequedad para dar un sólido de color naranja. El sólido naranja se suspendió en THF anhidro (1,5 L) y se transfirió a un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, de 5 L, dotado de un agitador en cabeza, sonda de temperatura y un embudo de adición con una entrada de N₂. A esta suspensión agitada se añadió MeI (1668 mL) lentamente, por partes. La primera parte (80 mL) dio como resultado un exotermo y la temperatura de la disolución aumentó de 23 a 26°C. La mezcla de reacción se enfrió externamente con hielo-agua y se añadió otra parte de MeI (20 mL). Mientras continuaba la adición de MeI, la temperatura cayó y se añadió otra parte de MeI (780 mL) sin exotermo observado. El baño de hielo se retiró y se añadió la parte final de MeI (788 mL) sin exotermo observado. Después de completarse la adición, la mezcla de reacción se agitó en atmósfera de N₂ durante una noche y después se transfirió al congelador (-20°C) durante 72 horas. La mezcla de reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente, se filtró, y el sólido se lavó con Et₂O (2 x 500 mL) proporcionando el producto en forma de un sólido de color canela. Los sólidos se secaron a vacío a temperatura ambiente durante una noche para dar el producto deseado (556,6 g, 91,0%) en forma de un sólido de color canela.

Intermedio 23

4-hidroxi-6-metil-2-(metiltio)-5-pirimidina-carboxilato de etilo

Un matraz de fondo redondo de 3 cuellos, de 12 L, dotado de un agitador en cabeza, un embudo de adición, con una entrada de N₂, y termómetro, se cargó con el Intermedio 22 (556,6 g, 1,94 mmol) y diclorometano anhidro (5 L). La mezcla de reacción se enfrió hasta ~2°C (baño de hielo) mientras se agitó bajo atmósfera de N₂, y se añadió cloruro de etilmalonilo (350 g, 2,33 mol). Después de la adición, la reacción se agitó a ~2°C durante 1,5 horas adicionales. A esta suspensión se añadió trietilamina (648 mL, 4,66 mol) gota a gota, manteniendo la reacción por debajo de 5°C durante la adición (2,5 h). Tras completarse la adición, la reacción se dejó calentar hasta temperatura ambiente mientras se agitaba bajo atmósfera de N₂ durante una noche. La mezcla de reacción se acidificó hasta pH~4 añadiendo 525 mL de disolución acuosa de HCl al 10%. La capa orgánica se separó y se lavó con salmuera (1 x 1050 mL). Se añadieron otros 750 mL de salmuera a la capa orgánica y el pH de la capa de salmuera se ajustó de 5~5 a aproximadamente 7 añadiendo una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (~225 mL) por partes. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄ durante 1,5 horas, se filtró, y se concentró mediante un evaporador rotatorio para proporcionar un sólido naranja gomoso, que se secó a alto vacío a temperatura ambiente durante una noche. El residuo húmedo gomoso (~579,5 g) se trituró con 1,2 L de hexanos:EtOAc (1:1) durante 3 horas. La mezcla se filtró, proporcionando un sólido amarillo gomoso que se secó a alto vacío durante una noche. El sólido amarillo (~400 g) se recogió en 2,8 L de diclorometano

ES 2 285 517 T3

y la suspensión heterogénea resultante se filtró. La disolución transparente de diclorometano se cromatografió sobre SiO₂ con 0-10% EtOAc-diclorometano. Las fracciones ricas en producto se recogieron, se concentraron y se volvieron a cromatografiar con 0-10% EtOAc-diclorometano. Las fracciones ricas en producto se concentraron, se trituraron con 800 mL de hexanos:EtOAc (1:1) durante una noche, y se filtraron. El sólido amarillo se secó a alto vacío durante una
5 noche para dar el producto deseado (113,6 g, 26%) en forma de un sólido amarillo pálido.

Intermedio 24

10 *Éster etílico del ácido 4-cicloheptiloxi-6-metil-2-metilsulfanil-pirimidina-5-carboxílico*

El Intermedio 23 (3,00 g, 13,2 mmol) se combinó con cicloheptanol (1,75 mL, 14,5 mmol), DEAD (3,12 g, 19,8 mmol), y trifenilfosfina (5,19 g, 19,8 mmol) en THF (60 mL). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 18 horas. El análisis por HPLC indicó un nuevo producto, junto con un exceso de trifenilfosfina y óxido de trifenilfosfina. La mezcla de reacción se concentró a vacío. El concentrado se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en
15 gradiente en 0-17% EtOAc-hexanos, TLC en 10% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (3,64 g, 85% de rendimiento) en forma de un aceite rosa claro. MS: M+1 = 325,1 (APCI).

Intermedio 25

20 *Éster etílico del ácido 4-cicloheptiloxi-2-metanosulfinil-6-metil-pirimidina-5-carboxílico*

A una disolución agitada del Intermedio 24 (3,252 g, 10,04 mmol) en cloroformo (50 mL) se añadió mCPBA (2,71 g, 12,1 mmol) por partes. Se agitó entonces la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 40 minutos. Se
25 añadió otra parte de mCPBA (350 mg) y se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. La mezcla se calmó con NaHCO₃ acuoso saturado y se diluyó con agua. La dilución se extrajo varias veces con diclorometano. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado (3,57 g) en forma de un aceite incoloro. El producto se utilizó después sin purificación adicional. MS: M+1 = 341,1 (APCI).

30 Intermedio 26

Éster etílico del ácido 4-cicloheptiloxi-6-metil-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Se agitó el Intermedio 25 (0,298 g, 0,876 mmol) en morfolina (0,381 mL) a 100°C durante una hora. Se dejó
35 enfriar la reacción hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en gel de sílice (elución en gradiente 0-50% EtOAc-hexanos, TLC en 20% EtOAc-Hexanos) para dar el producto del título deseado (0,274 g, 86,2% de rendimiento) en forma de un aceite incoloro. MS: M+1 = 364,1 (APCI). Microanálisis: Calculado C-62,79%, H-8,04%, N-11,56%. Encontrado C-62,42%, H-8,13%, N-11,59%.

40 Intermedio 27

Ácido 4-cicloheptiloxi-6-metil-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico

Se agitó el Intermedio 6 (0,237 g, 0,653 mmol) con dioxano (3 mL) 1y LiOH 1N (2 mL) en un matraz de fondo
45 redondo a 80°C durante seis horas. Se dejó enfriar la mezcla hasta la temperatura ambiente y después se acidificó lenta y cuidadosamente con HCl 1N hasta un pH~1. La mezcla ácida se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron para dar el producto del título deseado (0,218 g, 100% de rendimiento), en forma de un aceite que
50 solidificó al reposar. MS: M+1 = 336,1 (APCI).

Ejemplo 22

55 *(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-6-metil-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico*

Se mezcló el Intermedio 27 (0,131 g, 0,391 mmol) -pero no se disolvió- con diclorometano anhidro (2,5 mL). Se
Se añadió una gota de DMF. Se añadió cloruro de oxalilo (0,0406 mL, 0,469 mmol) mediante una jeringuilla. La
mezcla burbujeó y lentamente se hizo homogénea. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante diez minutos.
El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó el consumo completo del ácido de partida y
60 la formación de un producto nuevo, menos polar. Se añadieron 5-aminotetrazol (0,0565 g, 0,665 mmol), trietilamina (0,114 mL, 0,821 mmol), y finalmente acetonitrilo (2,5 mL). La reacción se agitó a 80°C durante 30 minutos. El análisis por HPLC de una alícuota calmada en MeOH/K₂CO₃ indicó un producto nuevo. Se retiró el baño de aceite y la mezcla se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. La mezcla se acidificó con HCl 1N, se diluyó con H₂O, y se extrajo varias veces con EtOAc. Los extractos orgánicos se combinaron, lavaron con salmuera, se secaron sobre
65 Na₂SO₄, se filtraron a través de celite, y se concentraron. El producto bruto se purificó por HPLC de fase inversa, de escala preparativa para dar el producto del título deseado (0,040 g, 24,4%) en forma de un sólido blanco.

ES 2 285 517 T3

El Intermedio 4 se preparó también según el siguiente procedimiento: Se agitó hidrobromuro de morfolinoformamida (10,00 g, 77,42 mmol) con etoximetilenmalonato de dietilo (23,5 mL, 116 mmol) y acetato de sodio (14,0 g, 2,20 mmol) en DMF (240 mL) a 110°C durante 18 horas. La reacción pasó lentamente de amarillo claro a rojo durante las primeras horas. El análisis por HPLC indicó la formación del producto deseado. La mezcla de reacción se concentró a vacío. El residuo remanente se suspendió en H₂O (150 mL) a temperatura ambiente durante una hora para dar un precipitado sólido beige. El sólido se filtró, se aclaró con H₂O, y se secó en la estufa de vacío. El precipitado seco se suspendió después en Et₂O (70 mL) a temperatura ambiente durante veinte minutos. La mezcla se filtró y el precipitado se aclaró con una cantidad mínima de Et₂O. El sólido se recogió y se secó durante una noche a vacío para dar el producto deseado, éster etílico del ácido 4-hidroxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico (Intermedio 4, 7,251 g, 59,9% de rendimiento), en forma de un sólido beige lanudo.

Ejemplo biológico 1

Expresión de la proteína PI3K γ y protocolo de purificación

Se co-infectaron células de *Spodoptera frugiperda*, cultivadas en un medio ESF921, con baculovirus que expresaban una p101 marcada con glu y baculovirus que expresaban una p110 γ marcada con HA, a una relación 3:1 del baculovirus de la p101 al baculovirus de la p110 γ . Se cultivaron células Sf9 hasta 1×10^7 células totales/ml en biorreactores de 10 L, y se recogieron 48-72 horas después de la infección. Se ensayó entonces, en muestras de células infectadas, la expresión de PI3 cinasa con p101/p110 γ por métodos de inmunoprecipitación y análisis Western Blot (véase más adelante).

Para purificar la PI3K γ , se vertieron 4 volúmenes de tampón hipotónico para lisis a temperatura ambiente (MgCl₂ 1 mM, DTT 1 mM, EGTA 5 mM, Pefabloc 1 mM, aprotinina 0,5 μ M, leupeptina 5 μ M, pepstatina 2 μ M, E64 5 μ M, pH 8) por gramo de pasta celular, sobre gránulos de células heladas, con agitación, después se lisaron en una "bomba" de nitrógeno a 2,76 MPa (599HC T316, Parr Instrument Co, Moline, IL). Se añadió NaCl hasta 150 mM, y se añadió colato de sodio hasta 1% y se mezcló durante otros 45 minutos. Los lisados se clarificaron por centrifugación durante 25 minutos a 14.000 rpm. Los lisados se cargaron entonces sobre bolas de sefrosa con proteína G enlazada con anticuerpo anti-glu (Covance Research Products, Richmond, CA) usando 20 ml de resina/50 g de pasta celular. La columna se lavó con 15 volúmenes de tampón de lavado (DTT 1 mM, EGTA 0,2 mM, Pefabloc 1 mM, aprotinina 0,5 μ M, leupeptina 5 μ M, pepstatina 2 μ M, E64 5 μ M, NaCl 150 mM, colato de sodio al 1%, pH 8). La PI3K γ se eluyó con 6 volúmenes de columna de tampón de lavado que contenían 100 μ g/ml de un péptido que compite por la unión del marcador glu. Las fracciones de la columna con la proteína eluida (determinada tomando lecturas de DO₂₈₀) se recogieron y dializaron en EGTA 0,2 mM, DTT 1 mM, Pefabloc 1 mM, leupeptina 5 μ M, colato de sodio al 0,5%, NaCl 150 mM, y glicerol al 50%, pH 8. Las fracciones se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

Ejemplo biológico 2

Expresión de subunidades de la proteína G

Se co-infectaron células de *Spodoptera frugiperda* con baculovirus que expresaban una proteína G β_1 marcada con glu y baculovirus que expresaban una proteína G β_2 , a una relación 1:1 del baculovirus con proteína G β_1 marcada con glu al baculovirus con proteína G β_2 . Se cultivaron células Sf9 en biorreactores de 10 l, y se recogieron 48-72 horas después de la infección. Se ensayó, en muestras de células infectadas, la expresión de proteína G β_1/β_2 por análisis Western Blot como se describe más adelante. Los lisados de las células se homogeneizaron y se cargaron en una columna de bolas marcadas con glu como en el Ejemplo Biológico 1 y compitieron fuera de la columna con un péptido glu y se procesaron como se describe en el Ejemplo Biológico 1.

Ejemplo biológico 3

Análisis Western Blot

Las muestras de proteínas se hicieron correr en un gel de Tris 8%-Glicina y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 45 μ M. Las manchas fueron bloqueadas entonces con suero de albúmina bovina al 5% (BSA) y ovoalbúmina al 5% en TBST (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0,1%, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubaron durante una noche a 4°C con anticuerpo primario diluido 1:1000 en TBST con BSA al 0,5%. Los anticuerpos primarios para las subunidades p110 γ , p110 α , p110 β , p85 α , β_1 de la proteína G, y γ_2 de la proteína G fueron adquiridas en Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA. Los anticuerpos anti-subunidad p101 fueron desarrollados en Research Genetics, Inc., Huntsville, AL, basándose en un antígeno del péptido p101.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las manchas se lavaron en TBST y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo anti-conejo, conjugado con PRP (Peroxidasa de Rábano Picante), de cabra (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, Número de producto 170-6515), se diluyeron 1:10.000 en TBST con BSA al 0,5%. Los anticuerpos fueron detectados con reactivos de detección ECLTM (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, Nueva Jersey) y se cuantificaron en un escáner Kodak ISO400F.

Ejemplo biológico 4

Inmunoprecipitación

- 5 Se derritieron y lisaron sobre hielo 100 μ l de la pasta celular del Ejemplo Biológico 1 ó 2 con 400 μ l de tampón hipotónico para lisis (tris 25 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Pefabloc 1 mM, leupeptina 5 μ M, E-64 (Roche) 5 μ M, Nonidet P40 al 1%, pH 7,5-8). El lisado se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con bolas marcadas con glu (Covance Research Products, Cambridge, Inglaterra, Número de producto AFC-115P). Las bolas se lavaron 3 veces en
10 tampón de lavado (Tris 20 mM, pH 7,8-8, NaCl 150 mM, NP40 al 0,5%) y la proteína se eluyó de las bolas calentando en 2 veces el tampón de muestras (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, Número de producto LC 1676).

Ejemplo biológico 5

Ensayo in vitro de la cinasa PI3K γ

- 15 Se ensayaron las propiedades inhibitorias de los compuestos de la Tabla 1 en un ensayo *in vitro* de PI3K. En una placa de polipropileno de 96 pocillos, cada pocillo fue moteado con 2 μ l de 50 veces la concentración final deseada del compuesto en DMSO. Se combinaron proteína recombinante p101/p110 purificada (0,03 g; -2,7 nM) y subunidades β_1/γ_2 de la proteína G (0,09 μ g; -57,7 nM) para cada reacción en el tampón de ensayo (HEPES 30 mM, NaCl 100 mM, EGTA 1 mM, y DTT 1 mM). Se añadió ATP y [γ -³²P-ATP] (0,09 μ Ci) a esta mezcla de tal modo que
20 la concentración final de ATP en la reacción fue 20 μ M. Se formaron micelas lípidas sonicando fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂), fosfatidiletanolamina (PE), y colato de sodio en el tampón de ensayo durante 10 minutos, añadiendo MgCl₂ e incubando en hielo durante 20 minutos, para las concentraciones finales de PIP₂ 25 μ M, PE 300 μ M, colato de sodio 0,02%, y MgCl₂ 10 mM en la reacción. Las reacciones se iniciaron añadiendo volúmenes iguales de las mezclas
25 de lípidos y de enzimas en un volumen total de 50 μ l, se dejaron proceder durante 20 minutos a temperatura ambiente, y se detuvieron con 100 μ l de H₃PO₄ 75 mM. El producto lípido se transfirió a una placa de filtro de fibra de vidrio, y se lavó varias veces con H₃PO₄ 75 mM. La presencia de producto lípido radioactivo (PIP₃) se midió añadiendo mezcla Optiphase de Wallac a cada pocillo y contando en un lector de placas Wallac 1450 Trilux (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA 02118). La IC₅₀ para cada compuesto ensayado se da en μ M en las Tablas anteriores.

30 Ejemplo biológico 6

Artritis murina inducida por colágeno

- 35 Se diluyó colágeno bovino de tipo II (Universidad de Utah) con ácido acético 0,01 N hasta una concentración de 2 mg/mL y se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, Michigan) suplementado con 1 mg/mL de Mycobacterium tuberculosis Hra37. Se inmunizaron ratones hembra DBA/1 LacJ de la misma edad (8-12 semanas) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) con 100 μ l de la emulsión (100 μ g de colágeno) por vía intradérmica en la base de la cola. En el día 28 después de la inmunización, se les dio a los
40 ratones 50 μ g de Lipopolisacárido (Sigma Aldrich, St Louis, Missouri) por vía intraperitoneal (IP) en 100 μ l de suero salino. El compuesto del Ejemplo 1 (2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico fue dosificado a 30 mg/kg por día mediante sonda gástrica oral durante dos semanas comenzando el día 27. El desarrollo de la artritis se evaluó en los días 27, 31, 34, 37, y 41. Se dio una puntuación clínica a cada miembro usando la siguiente escala: (0) normal, (1) eritema y edema, (2) distorsión de la articulación, (3) anquilosis de la
45 articulación. Las medidas del edema en las patas delanteras, patas traseras y tobillos se tomaron usando calibradores de tensión constante (Dyer, Lancaster, Pennsylvania). El compuesto del Ejemplo 1 a 30 mg/kg por día inhibió el edema de las patas en este modelo hasta el 52%, y la puntuación clínica hasta 35%.

Ejemplo biológico 7

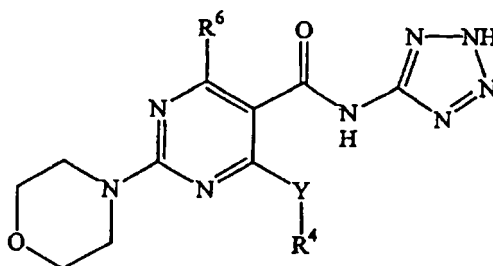
- 50 *Edema de las patas inducido por la pared celular estreptocócica - SCW*

- Ratas Lewis hembra (150 g) recibieron 6 μ g de SCW en 10 μ l de PBS de Dulbecco por una inyección intraarticular en la articulación tibiotalar derecha en el día 0. En el día 21, la respuesta de recurrencia se inició con 100 μ g de SCW
55 (250 μ l, vía intravenosa). Se dio por vía oral un vehículo (hidroxipropilmetilcelulosa 0,5%/Tween 80 0,2%) o el compuesto del Ejemplo 1 ((2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico) (volumen 10 ml/kg), por día, 1 h antes de la SCW, vía intravenosa, y en los días posteriores. Los volúmenes de línea de base de la pata trasera sensibilizada se midieron mediante un pletismómetro de desplazamiento de mercurio antes del inicio de la enfermedad en el día 21, y se sustrajeron de las evaluaciones posteriores (hechas 24 h después de cada
60 dosis) para determinar el valor Δ (la diferencia entre el volumen de la pata antes del inicio de la enfermedad en el día 21 y el volumen de la pata 24 horas después de cada dosis). El compuesto del Ejemplo 1 se dosificó a 10, 30 y 100 mg/kg por día por sonda gástrica oral durante cuatro días, comenzando en el día 21. El compuesto del Ejemplo 1 inhibió el edema de la pata en este modelo con una DI₅₀ de 16,3 mg/kg.

- 65 Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son sólo para fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



o una de sus sales farmacéuticamente aceptables;

en la que:

R⁶ es hidrógeno o metilo;

Y es O, NH, ó S;

R⁴ se selecciona del grupo que consiste en: un alquilo C₂-C₆, un -L-cicloalquilo C₃-C₈, un adamantilo, un hetero-cicloalquilo de 5 ó 6 miembros, y -J-R^c;

en la que R^c es un grupo fenilo o un grupo naftilo,

en la que L está ausente o es un alquilenos C₁-C₃, y

en la que J está ausente o es un alquilenos C₁-C₄.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es O, R⁶ es hidrógeno, y R⁴ es un cicloalquilo C₃-C₈.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que dicho compuesto es:

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclooctiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2-ciclohexil-etoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilmetoxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,3-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(adamantan-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(biciclo[2.2.1]hept-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es O, R⁶ es hidrógeno, y R⁴ es un cicloalquilo C₃-C₈ ó un alquilenos C₁-C₃-cicloalquilo C₃-C₈.

6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es O, R⁶ es hidrógeno, y R⁴ es un heterocicloalquilo de 5 ó 6 miembros.

7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R⁴ es un tetrahidropiranilo.

ES 2 285 517 T3

8. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es O, R⁶ es hidrógeno, y R⁴ es un grupo fenilo.

9. El compuesto de la reivindicación 8, en el que dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en:

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-ciclohexil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.

10. El compuesto de la reivindicación 1, en el que Y es NH, y R⁶ es hidrógeno.

11. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 en la fabricación de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, osteoartritis, artritis psoriática, psoriasis, enfermedades inflamatorias, y enfermedades autoinmunes.

12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicho compuesto es un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

13. Una composición farmacéutica que comprende:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Una composición farmacéutica que comprende:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-cicloheptiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclopentiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclooctiloxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(2-ciclohexil-etoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-ciclohexilmetoxi-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,3-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(3,5-dimetil-ciclohexiloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(adamantan-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(biciclo[2.2.1]hept-2-iloxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico;

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-isopropil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico; y

(2H-tetrazol-5-il)-amida del ácido 4-(4-ciclohexil-fenoxi)-2-morfolin-4-il-pirimidina-5-carboxílico.