

MODULADORES DE TREX1

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/776,301, presentada el 6 de diciembre de 2018, cuyo contenido completo se incorpora a la presente como referencia.

ANTECEDENTES

Se necesita una terapia inmune potencial para cánceres relacionados con el reconocimiento innato del sistema inmunitario de lo no propio y para detectar y proteger contra posibles peligros. Las células cancerosas difieren de manera antigénica de sus contrapartes normales y emiten señales de peligro para alertar al sistema inmunitario de manera similar a una infección viral. Estas señales, que incluyen patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados al patógeno (PAMP, por sus siglas en inglés), activan adicionalmente el sistema inmunitario innato que da como resultado la protección del hospedador de una diversidad de amenazas (*Front. Cell Infect. Microbiol.* **2012**, 2, 168).

El ADN de cadena simple (ADNcs) y ADN de cadena doble (ADNcd) expresados de manera ectópica son PAMP y/o DAMP conocidos, los cuales son reconocidos por la GMP-AMP sintasa cíclica (cGAS, por sus siglas en inglés), un sensor del ácido nucleico (*Nature* **2011**, 478, 515-518). Al detectar ADN citosólico, la cGAS cataliza la generación del dinucleótido 2',3'-cGAMP cíclico, un segundo mensajero y activador potente del estimulador de la proteína adaptadora transmembrana del RE de genes de interferón (STING) (*Cell Rep.* **2013**, 3, 1355-1361). La activación de STING desencadena la fosforilación de IRF3 mediante TBK1 que a su vez conduce a la producción de interferón tipo I y la activación de genes estimulados por interferón (ISG, por sus siglas en inglés); un pre-requisito de la activación de la inmunidad innata y el inicio de la inmunidad adquirida. La producción de los interferones de tipo I, por lo tanto, constituye un puente esencial entre la inmunidad adquirida y la innata (*Science* **2013**, 341, 903-906).

El IFN de tipo I en exceso puede ser perjudicial para el hospedador e inducir autoinmunidad, por lo tanto, existen mecanismos de retroalimentación negativa que mantiene controlada la activación inmune mediada por IFN de tipo I. Tres exonucleasas I de reparación principal (TREX1) es una exonucleasa de ADN 3'-5' responsable por el retiro de ADNcs y ADNcd expresados de manera ectópica y, por lo tanto, es un represor esencial de la vía de cGAS/STING (*PNAS* **2015**, 112, 5117-5122).

Las respuestas de interferones tipo I y la citocina pro-inflamatoria posterior son cruciales para el desarrollo de las respuestas inmunitarias y su eficacia. Los interferones de tipo I potencian tanto la habilidad de células dendríticas y macrófagos para absorber, procesar, presentar y presentar de manera cruzada antígenos a linfocitos T y su potencia para estimular linfocitos T al suscitar la

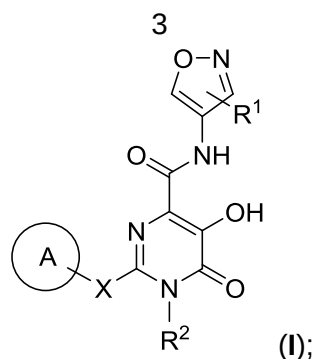
regulación por aumento de las moléculas coestimulantes tales como CD40, CD80 y CD86 (*J. Exp. Med.* **2011**, 208, 2005-2016). Los interferones de tipo I también se unen a sus propios receptores y activan los genes que responden a interferones que contribuyen a la activación de células implicadas en la inmunidad adquirida (*EMBO Rep.* **2015**, 16, 202-212).

- 5 De una perspectiva terapéutica, los interferones de tipo I y compuestos que pueden inducir la producción de interferón de tipo I tienen el potencial para uso en el tratamiento de cánceres humanos (*Nat. Rev Immunol.* **2015**, 15, 405-414). Los interferones pueden inhibir la proliferación de células tumorales humanas de manera directa. Además, los interferones de tipo I pueden mejorar la inmunidad antitumoral al activar la activación de células de tanto el sistema inmunitario
- 10 innato como adquirido. Cabe destacar que la actividad anti-tumoral del bloqueo de PD-1 requiere linfocitos T intratumorales preexistentes. Al convertir tumores fríos en calientes y suscitar así una inmunidad antitumoral espontánea, las terapias que inducen IFN de tipo I tienen el potencial de expandir el grupo de pacientes que responden a terapia anti-PD-1 así como mejorar la eficacia de terapia anti-PD1.
- 15 Las terapias que están en desarrollo actualmente que inducen una respuesta de interferón de tipo I potente requieren la administración intratumoral o focal para lograr un índice terapéutico aceptable. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de nuevos agentes con administración sistémica y una menor toxicidad para ampliar el beneficio de las terapias que inducen IFN de tipo I a pacientes sin lesiones accesibles con tratamiento periférico. Los estudios genéticos en ratones y humanos
- 20 sugieren que la inhibición de TREX1 puede ser susceptible a una vía de administración sistémica y, por lo tanto, los compuestos inhibidores de TREX1 pueden desempeñar un papel importante en el panorama de la terapia anti-tumoral. TREX1 es un determinante clave para la inmunogenicidad limitada de las células cancerosas que responden al tratamiento con radiación [*Trends in Cell Biol.*, **2017**, 27 (8), 543-4; *Nature Commun.*, **2017**, 8, 15618]. TREX1 se induce por estrés genotóxico y
- 25 está implicado en la protección de células de glioma y melanoma contra fármacos anticancerígenos [*Biochim. Biophys. Acta*, **2013**, 1833, 1832-43]. La terapia STACT-TREX1 demuestra eficacia anti-tumoral fuerte en múltiples modelos de cáncer murino [Glickman et ál, Poster P235, 33rd Annual Meeting of Society for Immunotherapy of Cancer, Washington DC, 7-11 de noviembre, **2018**].

30 COMPENDIO

Las modalidades que se describen en la presente generalmente se relacionan con agentes, compuestos, composiciones y métodos para tratar enfermedades que responden a los inhibidores de TREX1. Los inhibidores de TREX1 selectivos sobre inhibidores de TREX2 se han sintetizado de manera exitosa en la presente invención.

- 35 En la presente se proporcionan compuestos que tienen la Fórmula I:



y sales farmacéuticamente aceptables y composiciones de estas, en donde A, R¹, R² y n son como se describe en la presente. Los compuestos y composiciones descritos modulan TREX1, y son útiles en una variedad de aplicaciones terapéuticas tales como, por ejemplo, el tratamiento del cáncer.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A ilustra los resultados de un experimento de silenciamiento de TREX1 en células tumorales B16F10 usando CRISPR.

La Figura 1B ilustra que TREX1 atenuó la activación de la vía cGAS/STING en células tumorales B16F10.

La Figura 2: ilustra que los tumores en los que TREX se silenció tenían volúmenes menores en comparación con tumores B16F10 parentales.

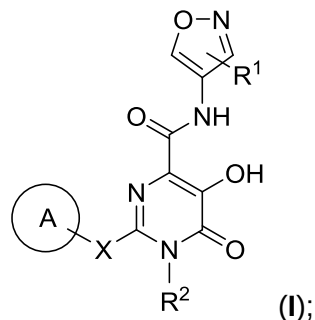
La Figura 3: muestra que la inactivación con TREX1 en tumores B16F10 exhibió un aumento significativo en células inmunitarias en general. Esto reflejó un aumento en la cantidad de tumores que infiltran los linfocitos T CD8 y CD4 así como en las células dendríticas plasmocitoides (pDC, por sus siglas en inglés).

La Figura 4: muestra la actividad de determinados compuestos inventivos en líneas celulares de carcinoma colorrectal HCT116 humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

1. Descripción general de los compuestos

En una primera modalidad, se provee en la presente un compuesto de la Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

R¹ es hidrógeno, alquilo(C₁-C₄), haloalquilo(C₁-C₄), cicloalquilo de 3 a 4 miembros, -OR^f, -

SR^f o $-NR^eR^f$;

R^2 es hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), o cicloalquilo de 3 a 4 miembros;

X es un enlace, NR^3 , O, S, o alquilenio(C_1-C_4), en donde dicho alquilenio(C_1-C_4) se sustituye opcionalmente con 1 a 2 grupos seleccionados de R^4 ;

5 R^3 es hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), $-C(O)R^d$ o $-C(S)R^d$;

R^4 es halo, alquilo(C_1-C_4), fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-NHC(S)OR^a$, $-C(O)R^b$, $-NHC(O)NHR^g$, $-NHC(S)NHR^g$, $-NHS(O)_2NHR^g$, $-C(S)R^b$, $S(O)_2R^c$, $S(O)R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(S)OR^d$, $-C(O)NHR^e$, $-C(S)NHR^e$, $-NHC(O)R^d$, $-NHC(S)R^d$, $-OR^e$, $-SR^e$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$ o $-NR^eR^f$, en donde dicho fenilo para R^4 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo, alquilo(C_1-
10 C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4) y haloalcoxi(C_1-C_4);

El anillo A es fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros, heterociclilo de 4 a 7 miembros, o cicloalquilo de 3 a 7 miembros, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^5 ;

R^5 es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-NHC(S)OR^a$, $-C(O)R^b$, $-NHC(O)NHR^g$, $-NHC(S)NHR^g$, $-NHS(O)_2NHR^g$, $-C(S)R^b$, $S(O)_2R^c$, $S(O)R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(S)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-C(S)NHR^e$, $-NHC(O)R^d$, $-NHC(S)R^d$, $-OR^e$, $-SR^e$, $-Oalquilo(C_1-$
15 $C_4)OR^e$, $-NR^eR^f$, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho fenilo para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de OR^h , $-NR^jR^k$, fenilo, y heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heterociclilo de 4 a 7 miembros y heteroarilo de 4 a 6 miembros, se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , y en donde dicho fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g ;

25 R^g , R^h , R^j , R^k y R^m son cada uno independientemente hidrógeno, halo, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), fenilo, $-alquil(C_1-C_4)fenilo$, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, y en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^g , R^h , R^j y R^k se sustituye además opcionalmente con $=O$.

R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f son cada uno independientemente hidrógeno, halo, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde i) dicho alquilo(C_1-C_4) para R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, $-OR^h$, $-NR^jR^k$; ii) dichos fenilo, heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1
35 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , y iii) dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^a , R^b , R^c ,

R^d, R^e y R^f se sustituye opcionalmente además con =O.

2. Definiciones

Cuando se usa en relación con la descripción de un grupo químico que puede tener múltiples puntos de unión, un guión (-) designa el punto de unión de ese grupo a la variable con respecto a la cual se define. Por ejemplo, -NHC(O)OR^a y -NHC(S)OR^a significan que el punto de unión para este grupo ocurre en el átomo de nitrógeno.

Los términos «halo» y «halógeno» hacen referencia a un átomo que se selecciona de flúor (fluoro, -F), cloro (cloro, -Cl), bromo (bromo, -Br) y yodo (yodo, -I).

El término «alquilo» cuando se usa solo o como parte de un resto mayor, tal como «haloalquilo», y similares, significa un radical de hidrocarburo monovalente de cadena recta o ramificada saturada. A menos que se especifique lo contrario, un grupo alquilo típicamente tiene 1 a 4 átomos de carbono, es decir, alquilo(C₁-C₄).

El término «alquilen» se refiere a un hidrocarburo saturado divalente.

«Alcoxi» significa un radical alquilo unido mediante un átomo que se enlaza a oxígeno representado por -O-alquilo. Por ejemplo, «alcoxi(C₁-C₄)» incluye metoxi, etoxi, propoxi y butoxi.

El término «haloalquilo» incluye grupos mono, poli y perhaloalquilo donde los halógenos se seleccionan independientemente de flúor, cloro, bromo y yodo.

«Haloalcoxi» es un grupo haloalquilo que se une a otro resto mediante un átomo de oxígeno tal como, p. ej., pero de manera no taxativa a -OCHCF₂ o -OCF₃.

El término «heteroarilo» usado solo o como parte de un resto más grande se refiere a un radical aromático de 5 a 6 miembros que contiene 1-4 heteroátomos que se seleccionan de N, O y S. Heteroarilo incluye, por ejemplo, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, etc. Se entenderá que cuando se especifica, los sustituyentes opcionales en un grupo heteroarilo pueden estar presentes en cualquier posición sustituible.

El término «heterociclilo» significa un anillo heterociclilo saturado o parcialmente no saturado de 4 a 7 miembros que contiene 1 a 4 heteroátomos que se seleccionan independientemente de N, O y S. Un anillo heterocíclico puede unirse a su grupo pendiente en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que dé como resultado una estructura estable. Los ejemplos de tales radicales heterocíclicos saturados o parcialmente no saturados incluyen, de modo no taxativo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotienilo, tetrahidropiranilo, pirrolidinilo, piridinonilo, pirrolidonilo, piperidinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, morfolinilo, dihidrofuranilo, dihidropiranilo, dihidropiridinilo, tetrahidropiridinilo, dihidropirimidinilo, oxetanilo, azetidinilo y tetrahidropirimidinilo. Se entenderá también que cuando se especifica, sustituyentes opcionales en un grupo heterociclilo pueden estar presentes en cualquier posición sustituible e, incluyen, p. ej., la

posición en la que el heterociclilo está unido (p. ej., en el caso de un heterociclilo sustituido opcionalmente o heterociclilo que se sustituye opcionalmente).

El término «cicloalquilo» se refiere a un resto hidrocarburo cíclico que tiene, a menos que se especifique lo contrario, de 3 a 10 átomos de anillo de carbono. Los grupos cicloalquilo monocíclicos incluyen, de modo no taxativo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, cicloheptenilo y ciclooctilo. Se entenderá que cuando se especifica, sustituyentes opcionales en un grupo cicloalquilo o cicloalifático pueden estar presentes en cualquier posición sustituible e, incluyen, p. ej., la posición en la que el grupo cicloalquilo o cicloalifático está unido.

El término «TREX1» se refiere a Tres exonucleasas 1 de reparación principal o la exonucleasa de reparación de ADN 1, la cual es un enzima que en seres humanos se codifica por el gen TREX1. *Mazur DJ, Perrino FW (agosto de 1999). «Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'→5' exonucleases». J Biol Chem. 274 (28): 19655–60. doi:10.1074/jbc.274.28.19655. PMID 10391904; Hoss M, Robins P, Naven TJ, Pappin DJ, Sgouros J, Lindahl T (agosto de 1999). "A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein". EMBO J. 18 (13): 3868-75. doi:10.1093/emboj/18.13.3868. PMC 1171463. PMID 10393201.* Este gen codifica la exonucleasa de ADN 3'→5' principal en células humanas. La proteína es una exonucleasa no procesiva que puede servir como función correctora para la polimerasa de ADN humano. También es un componente del complejo SET y actúa para degradar rápidamente los extremos 3' del ADN cortado durante muerte celular mediada por la granzima A. Las células que carecen de TREX1 funcional muestran la activación de punto de control de daño de ADN crónico y la acumulación extra-nuclear de un sustrato de ADN de cadena simple endógeno. Parece que la proteína TREX1 generalmente actúa en una especie de polinucleótido de ADN de cadena simple generada al procesar intermedios de replicación aberrante. Esta acción de TREX1 atenúa la señalización del punto de control de daño de ADN y previene la activación inmune patológica. TREX1 metaboliza el ADN de cadena simple de transcripción inversa de retroelementos endógenos como una función de vigilancia antiviral intrínseca de la célula, lo que da como resultado una respuesta de IFN de tipo I potente. TREX1 ayuda al VIH-1 a evadir la detección citosólica al degradar ADNc viral en el citoplasma.

El término «TREX2» se refiere a Tres exonucleasas de reparación principal 2 es una enzima [sic] que en seres humanos se codifica por el gen TREX2. Este gen codifica una proteína nuclear con actividad de exonucleasa 3' a 5'. La proteína codificada participa en la reparación de la ruptura de ADN de cadena doble y puede interactuar con la polimerasa de ADN delta. Las enzimas con esta actividad están implicadas en la replicación, reparación y recombinación de ADN. TREX2 es una exonucleasa 3' que se expresa predominantemente en queratinocitos y contribuye a la respuesta

epidérmica a daño del ADN inducido por UVB. Las propiedades estructurales y bioquímicas de TREX2 son similares a las de TREX1, aunque no son idénticas. Las dos proteínas comparten una estructura dimérica y pueden procesar sustratos de ADNcs y ADNcd *in vitro* con valores de k_{cat} casi idénticos. Sin embargo, varias características relacionadas a enzimas cinéticas, dominios

5 estructurales y distribución subcelular distinguen a TREX2 de TREX1. TREX2 presenta una afinidad 10 veces menor para los sustratos de ADN *in vitro* en comparación con TREX1. En contraste con TREX1, TREX2 carece de un dominio del extremo COOH que puede mediar las interacciones proteína-proteína. TREX2 se ubica en tanto el citoplasma como el núcleo, mientras que TREX1 se encuentra en el retículo endoplasmático y se moviliza al núcleo durante la muerte

10 celular mediada por granzima A o después del daño de ADN.

Los términos «sujeto» y «paciente» se pueden usar indistintamente y significan un mamífero que necesite tratamiento, por ejemplo, animales de compañía (p. ej., perros, gatos y similares), animales de granja (p. ej., vacas, cerdos, caballos, ovejas, cabras y similares) y animales de laboratorio (p. ej., ratas, ratones, cobayos y similares). En general, el sujeto es un ser humano que

15 necesita tratamiento.

Las expresiones «inhibir», «inhibición» o «que inhibe» incluyen una disminución en la actividad de referencia de una actividad o proceso biológico.

Tal como se utiliza en la presente, las expresiones «tratamiento», «tratar» y «que trata» hacen referencia a revertir, aliviar, retrasar el comienzo o inhibir el progreso de una enfermedad o

20 trastorno, o uno o más síntomas de estos, tal como se describe en la presente. En algunos aspectos, puede administrarse el tratamiento luego de que se hayan desarrollado uno o más síntomas, es decir, tratamiento terapéutico. En otros aspectos, puede administrarse el tratamiento en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un individuo susceptible antes del comienzo de los síntomas (p. ej., en virtud de un historial de síntomas y/o en

25 virtud de la exposición a un organismo en particular u otros factores de susceptibilidad), es decir, tratamiento profiláctico. El tratamiento puede continuarse también luego de la resolución de los síntomas, por ejemplo, para retrasar su recurrencia.

El término «portador farmacéuticamente aceptable» se refiere a un portador, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que está formulado. Los

30 portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden utilizarse en las composiciones descritas en la presente incluyen, de modo no taxativo, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas en suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos,

35 tal como sulfato de protamina, hidrógenofosfato disódico, fosfato hidrogenado de potasio, cloruro

de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliacrilatos, ceras, polímeros bloqueadores de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Para su uso en medicamentos, las sales de los compuestos descritos en la presente se refieren a

5 «sales farmacéuticamente aceptables» no tóxicas. Las formas de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales ácidas/aniónicas o básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos descritos en la presente incluyen, p. ej., sales de ácidos inorgánicos (tales como ácido clorhídrico, ácidos bromhídrico, fosfórico, nítrico y sulfúrico) y de ácidos orgánicos (tales como ácido acético, 10 ácidos bencenosulfónico, benzoico, metanosulfónico y p-toluenosulfónico). Los compuestos de las presentes indicaciones con grupos ácidos tales como ácidos carboxílicos pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con una o más bases farmacéuticamente aceptables. Las sales básicas farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, p. ej., sales de amonio, sales de metales alcalinos (tal como sales de sodio y potasio) y sales de metales alcalinotérreos (tales 15 como sales de magnesio y de calcio). Los compuestos con un grupo de amonio cuaternario también contienen un contraión tal como cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato y similares. Otros ejemplos de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico.

La expresión «cantidad eficaz» o «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a una cantidad de 20 un compuesto descrito en la presente que suscitará una respuesta médica o biológica beneficiosa o deseada de un sujeto, p. ej., una dosificación de entre 0.01 - 100 mg/kg de peso corporal/día.

3. Compuestos

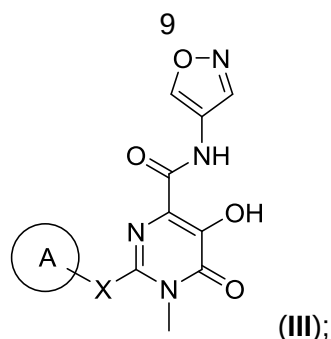
En una segunda modalidad, se provee en la presente un compuesto de la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables son como se describieron anteriormente en la primera modalidad.

En una tercera modalidad, R² es alquilo(C₁-C₄) en los compuestos de la Fórmula I o II.

En una cuarta modalidad, en la presente se proporciona un compuesto de la Fórmula III:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables son como se describieron anteriormente en la primera, segunda o tercera modalidad.

En una quinta modalidad, el anillo A en los compuestos de la Fórmula I, II, o III es fenilo, piridilo, pirazolilo, ciclopropilo, ciclobutilo, azetidinilo o piperidinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con uno o dos R^5 , en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, la segunda, la tercera o la cuarta modalidad. De manera alternativa, como parte de una quinta modalidad, el anillo A en los compuestos de la Fórmula I, II o III es triazolilo, pirrolidinilo, diazepanilo o piperazinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con uno o dos R^5 , en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, la segunda, la tercera o la cuarta modalidad.

En una sexta modalidad, R^5 en los compuestos de la Fórmula I, II o III es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-C(O)R^b$, $S(O)_2R^c$, $S(O)R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-NHC(O)R^d$, $-OR^e$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$, $-NR^eR^f$, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho fenilo para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de $-OR^h$, $-NR^iR^k$, fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros se seleccionan cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , y en donde dichos fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g ; R^a es alquilo(C_1-C_4) que se sustituye opcionalmente con fenilo; R^b es alquilo(C_1-C_4), fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho alquilo(C_1-C_4) se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, $-OR^h$ y $-NR^iR^k$, en donde dichos fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , y en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros se sustituye opcionalmente además con $=O$; cada R^c es independientemente fenilo o alquilo(C_1-C_4); cada R^d es hidrógeno o alquilo(C_1-C_4); cada R^e es independientemente hidrógeno o alquilo(C_1-C_4) opcionalmente sustituido con OR^h ; cada R^f es independientemente hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), fenilo, cicloalquilo de 3 a 4

miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 5 a 6 miembros, en donde dichos fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 5 a 6 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con R^g ; cada R^g es independientemente alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4) o halo; cada R^h es hidrógeno, alquilo(C_1-C_4) o -alquil(C_1-C_4)fenilo; cada R^j es independientemente hidrógeno o alquilo(C_1-C_4); cada R^k es independientemente hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), o cicloalquilo de 3 a 4 miembros; y cada R^m es alquilo(C_1-C_4), en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta modalidad.

En una séptima modalidad, R^5 en los compuestos de la Fórmula I, II o III es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-C(O)R^b$, $S(O)_2R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-NHC(O)R^d$, -Oalquilo(C_1-C_4) OR^e , $-NR^eR^f$, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 5 a 6 miembros, en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con $-OR^h$, fenilo, o heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 5 a 6 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , y en donde dichos fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta o sexta modalidad.

En una octava modalidad, R^5 en los compuestos de la Fórmula I, II o III es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-C(O)R^b$, $S(O)_2R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-NHC(O)R^d$, -Oalquilo(C_1-C_4) OR^e , $-NR^eR^f$, morfolinilo, piperazinilo o pirazolilo, en donde dichos morfolinilo, piperazinilo y pirazolilo se sustituyen cada uno opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con $-OR^h$, fenilo, pirazolilo, pirimidinilo o piridinilo, y en donde dichos fenilo, pirazolilo, pirimidinilo y piridinilo de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta o séptima modalidad.

En una novena modalidad, cada R^f en los compuestos de la Fórmula I, II o III es independientemente hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), fenilo, pirazolilo, piridinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, en donde dichos fenilo, pirazolilo, piridinilo, tetrahidropiranilo y piperidinilo se sustituyen cada uno opcional e independientemente con alquilo(C_1-C_4), en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima u octava modalidad.

En una décima modalidad, cada R^g en los compuestos de la Fórmula I, II o III es independientemente alquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4) o halo, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava o novena modalidad.

- 5 En una decimoprimera modalidad, R^b en los compuestos de la Fórmula I, II o III es alquilo(C_1-C_4), fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dichos fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros para R^b se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo y alcoxi(C_1-C_4), en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^b se sustituye opcionalmente con =O, y en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^b se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, $-OR^h$ y $-NR^jR^k$, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena o décima modalidad.

- 10 En una decimosegunda modalidad, cada R^k en los compuestos de la Fórmula I, II o III es independientemente hidrógeno o alquilo(C_1-C_4), en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima o decimoprimera modalidad.

- 15 En una decimotercera modalidad, R^b en los compuestos de la Fórmula I, II o III es alquilo(C_1-C_4), fenilo, piridinilo, pirazolilo, pirimidinilo o piperidinilo, en donde dichos fenilo, piridinilo, pirazolilo y pirimidinilo para R^b se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo y alcoxi(C_1-C_4), en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^b se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, OH y NMe_2 , y en donde dicho piperidinilo para R^b se sustituye opcionalmente con =O, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, decimoprimera o decimosegunda modalidad.

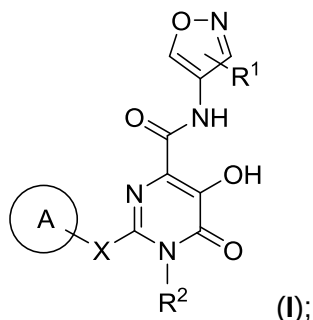
- 20 En una decimocuarta modalidad, R^3 en los compuestos de la Fórmula I, II o III es hidrógeno, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, decimoprimera, decimosegunda o decimotercera modalidad.

- 25 En una decimoquinta modalidad, R^4 en los compuestos de la Fórmula I, II o III es fenilo o $-NHC(O)OR^a$, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, decimoprimera, decimosegunda, decimotercera o decimocuarta modalidad.

- 30 En una decimosexta modalidad, X en los compuestos de la Fórmula I, II o III es un enlace o CH_2 , en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, decimoprimera,
- 35

decimosegunda o decimotercera modalidad.

En la presente también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden 1) un compuesto que tiene la Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde las variables restantes son como se describieron anteriormente para la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima o decimoprimerá modalidad y 2) un portador farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos que tienen la Fórmula I se describen adicionalmente en la Ejemplificación y se incluyen en la presente descripción. Se incluyen sales farmacéuticamente aceptables de estos así como las formas neutras.

4. Usos, formulación y administración

Los compuestos y composiciones descritos en la presente son generalmente útiles para modular la actividad de TREX1. En algunos aspectos, los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente inhiben la actividad de TREX1.

En algunos aspectos, los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente son útiles al tratar un trastorno asociado con la función de TREX1. Por lo tanto, en la presente se proporcionan métodos para tratar un trastorno asociado con la función de TREX1, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito o una sal farmacéuticamente aceptable de este. También se proporcionan el uso de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la elaboración de un medicamento para tratar un trastorno asociado con la función de TREX1. También se proporciona un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para el uso en el tratamiento de un trastorno asociado con TREX1.

En algunos aspectos, los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente son útiles para tratar el cáncer.

En algunos aspectos, el cáncer tratado por los compuestos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se selecciona de cáncer de colon, cáncer gástrico, cáncer de tiroides, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de páncreas, melanoma, melanoma múltiple, cáncer cerebral,

5 cáncer del SNC, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, leucemia y cáncer de mama.

En algunos aspectos, el cáncer tratado por los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal y melanoma.

10 En determinados aspectos, una composición farmacéutica descrita en la presente se formula para administración a un paciente que necesite dicha composición. Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden administrarse de forma oral, parenteral, por aspersión para inhalar, tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. El término «parenteral» tal como se utiliza en la presente incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea,

15 intravenosa, intramuscular, intrarticular, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En algunas modalidades, las composiciones son administradas de forma oral, intraperitoneal o intravenosa. Las formas inyectables estériles de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente pueden ser suspensiones acuosas u oleosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica mediante

20 el uso de agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas se administran por vía oral.

Un régimen de tratamiento y dosificación específicos para cualquier paciente particular dependerán de diversos factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la

25 velocidad de eliminación, la combinación de fármacos y el criterio del médico tratante y la gravedad de la enfermedad particular que se trata. La cantidad de un compuesto descrito en la composición dependerá también del compuesto particular de la composición farmacéutica.

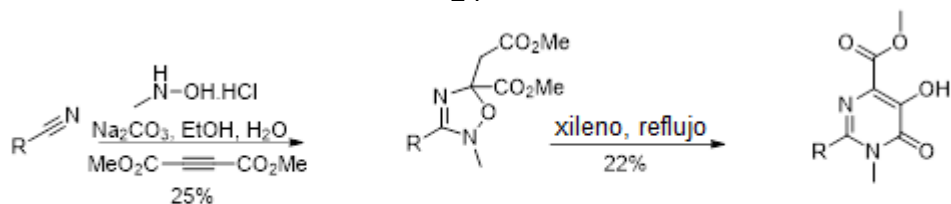
EJEMPLIFICACIÓN

Síntesis química

30 Los ejemplos representativos a continuación pretenden ayudar a ilustrar la presente descripción y no pretenden ni deberían entenderse como limitaciones al alcance de la invención.

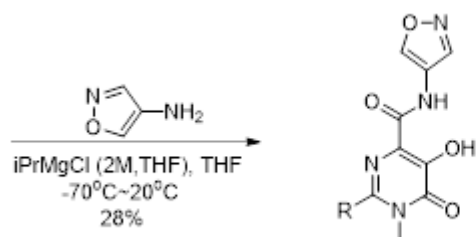
Esquema sintético general

14



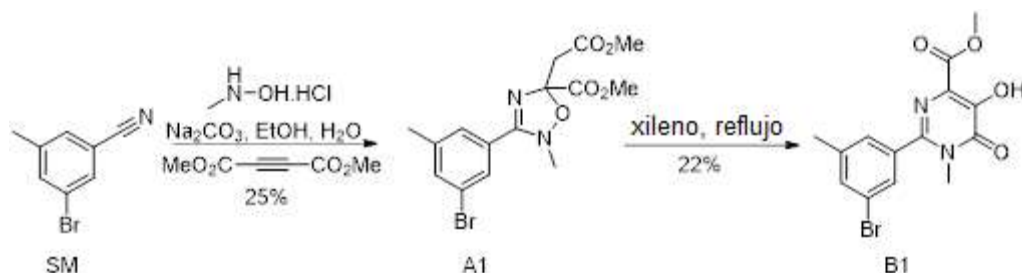
5

10

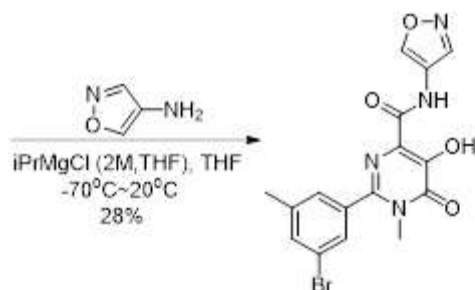


2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida

15



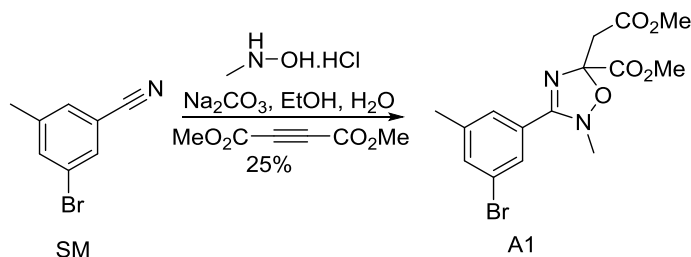
20



25

Etapas 1: Síntesis de metil 3-(3-bromo-5-metilfenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato

30



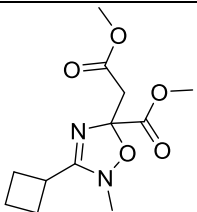
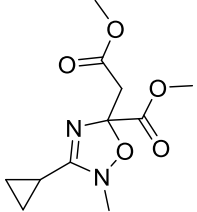
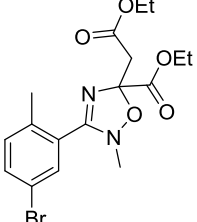
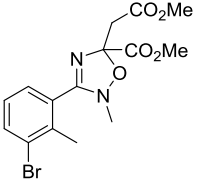
A una solución agitada de **SM** (5.16 g, 26.341 mmol, 2 equiv.), clorhidrato de N-metilhidroxilamina (1.10 g, 13.170 mmol, 1.00 equiv.) en H_2O (25.00 mL), EtOH (25.00 mL) se le agregó Na_2CO_3 (0.837 g, 7.902 mmol, 0.6 equiv.) en partes a temperatura ambiente. La solución resultante se

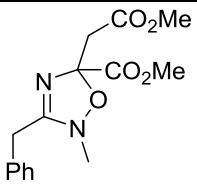
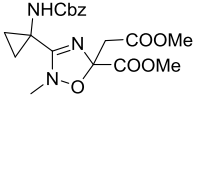
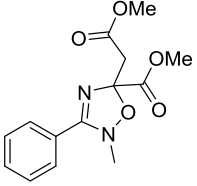
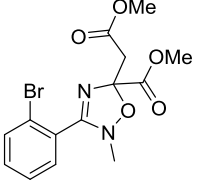
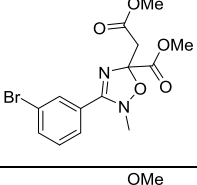
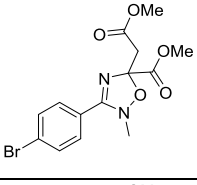
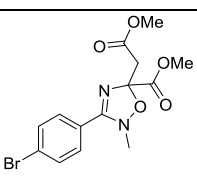
35

agitó durante 2 h a 80 °C. Hasta que la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se agregó 1,4-dimetil but-2-inedioato (2.06 g, 14.488 mmol, 1.1 equiv) gota a gota. Luego, la mezcla de reacción se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente. La solución resultante se extrajo con 3x30 mL de acetato de etilo y las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se concentraron al vacío. El residuo se aplicó a una columna de gel de sílice con acetato de etilo/éter de petróleo (1:5). Esto dio como resultado 1.3 g de **A1** (25 % de rendimiento) como un aceite amarillo claro. ESI-MS m/z = 385.0 $[M+H]^+$. MW calculado: 384.0. ^1H NMR (400 MHz, cloroformo-*d*) δ 7.67 (t, J = 1.8 Hz, 1H), 7.49 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.45 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 3.07 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 2.38 (d, J = 0.8 Hz, 3H).

Los siguientes intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

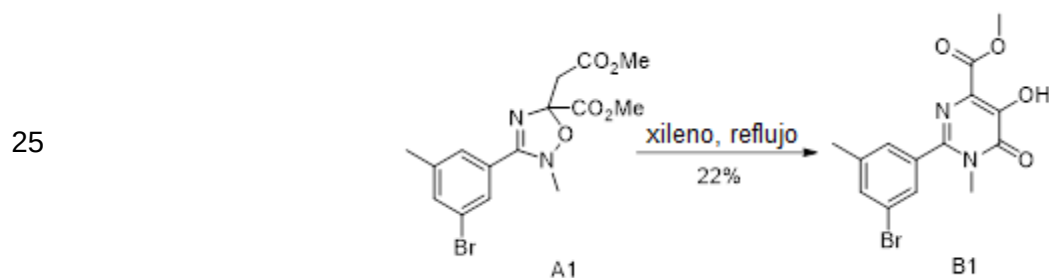
Tabla 1

Estructura	Nombre	Intermedio	LCMS
	3-ciclobutil-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A2	ESI-MS m/z = 271.1 $[M+H]^+$. MW calculado: 270.1
	3-ciclopropil-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A3	ESI-MS m/z = 257.1 $[M+H]^+$. MW calculado: 256.1
	3-(5-bromo-2-metilfenil)-5-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de etilo	A4	ESI-MS m/z = 413.2 $[M+H]^+$. MW calculado: 412.1
	3-(3-bromo-2-metilfenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A5	ESI-MS m/z = 385.0 $[M+H]^+$. MW calculado: 384.0

		3-bencil-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A6	ESI-MS m/z = 307.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 306.1
5		3-(1-(((benciloxi)carbonil)amino)ciclopropil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A7	ESI-MS m/z = 406.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 405.2
10		5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-3-fenil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A8	ESI-MS m/z = 293.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 292.29
15		3-(2-bromofenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A9	ESI-MS m/z = 373.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 372.19
20		3-(3-bromofenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A10	ESI-MS m/z = 373.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 372.19
25		3-(4-bromofenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A11	ESI-MS m/z = 373.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 372.19
30		3-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A13	ESI-MS m/z = 400.8 [M+H] ⁺ . MW calculado: 399.44

		3-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A14	ESI-MS m/z = 400.8 [M+H] ⁺ . MW calculado: 399.44
5		3-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A15	ESI-MS m/z = 400.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 399.44
10		3-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-2-il)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A16	ESI-MS m/z = 400.8 [M+H] ⁺ . MW calculado: 399.44
15 20		3-(3-bromo-2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)fenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	A17	ESI-MS m/z = 451.0 [M+H] ⁺ . MW calculado: 450.0

Etap 2: Síntesis de 2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo B1



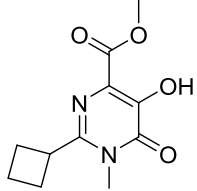
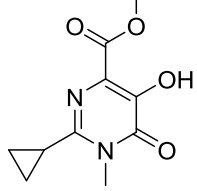
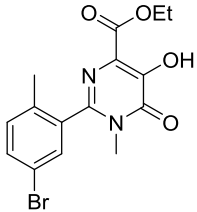
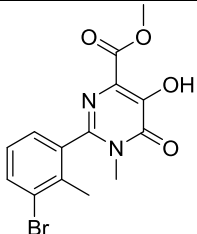
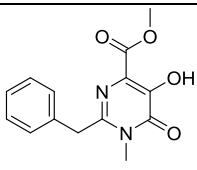
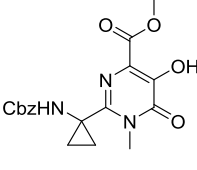
30

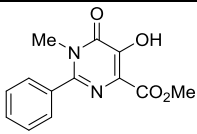
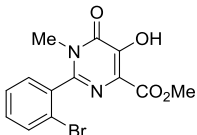
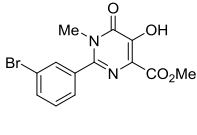
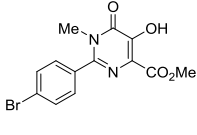
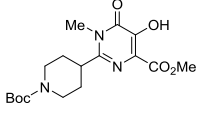
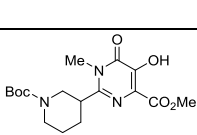
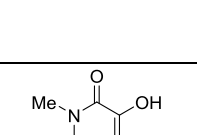
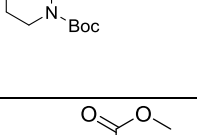
35

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocó 3-(3-bromo-5-metilfenil)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo (1.00 g, 2.596 mmol, 1.00 equiv.), xileno (20.00 mL). La solución resultante se agitó durante 5 h a 145 °C. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente. Los sólidos se recogieron mediante filtración y se lavaron con hexano. El sólido se secó a presión reducida. Esto dio como resultado 210 mg de 2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (22 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI-MS m/z = 353.0 [M+H]⁺. MW calculado: 352.0

Los siguientes intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

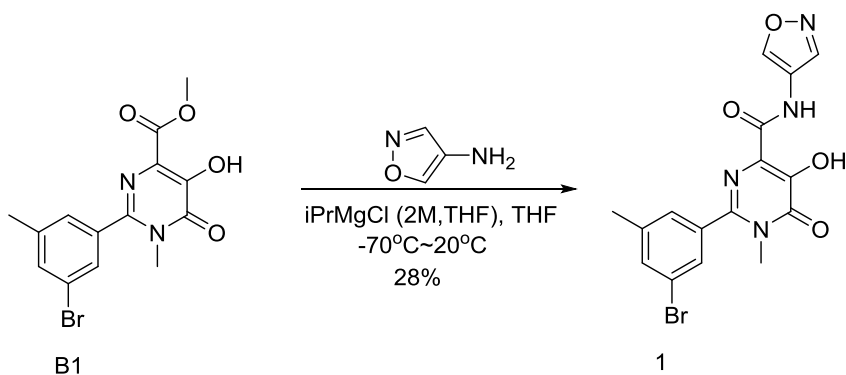
Tabla 2

Estructura	Nombre	Intermedio	LCMS
	2-ciclobutilo-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B2	ESI-MS m/z = 239.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 238.1
	2-ciclopropil-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B3	ESI-MS m/z = 225.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 224.0
	2-(5-bromo-2-metilfenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo	B4	ESI-MS m/z = 365.0 [M-H] ⁻ . MW calculado: 366.0
	2-(3-bromo-2-metilfenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B5	ESI-MS m/z = 353.0 [M+H] ⁺ . MW calculado: 352.0
	2-bencil -5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B6	ESI-MS m/z = 275.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 274.1
	2-(1-(((benciloxi)carbonil)amino)ciclopropil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B7	ESI-MS m/z = 374.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 373.1

5		5-hidroxi-1-metil-6-oxo-2-fenil-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B8	ESI-MS m/z = 261.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 260.2
		2-(2-bromofenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B9	ESI-MS m/z = 341.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 339.1
10		2-(3-bromofenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B10	ESI-MS m/z = 341.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 339.1
		2-(4-bromofenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B11	ESI-MS m/z = 341.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 339.1
15		2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-4-il)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B12	ESI-MS m/z = 368.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 367.40
		2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B13	ESI-MS m/z = 368.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 367.40
20		3-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-2-il)-5-(2-metoxi-2-oxoetil)-2-metil-2,5-dihidro-1,2,4-oxadiazol-5-carboxilato de metilo	B14	ESI-MS m/z = 368.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 367.40
		2-(3-bromo-2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)fenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo	B15	ESI-MS m/z = 513.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 512.1
30				

Etapas 3: Síntesis de 2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (Ejemplo 1)

5



10

15

20

En un tubo sellado de 8 mL, se colocó 2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (100.00 mg, 0.283 mmol, 1.00 equiv.), THF (2.50 mL), 1,2-oxazol-4-amina (71.42 mg, 0.849 mmol, 3.00 equiv.). Esto fue seguido de la adición de una solución de *i*PrMgCl (2 M, 0.64 mL, 4.50 equiv) gota a gota con agitación a -70 grados C. La solución resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción luego se inactivó mediante la adición de 2 mL de NH₄Cl sat. (ac.). El valor del pH de la solución se ajustó a 3 con HCl (4 M). La solución resultante se extrajo con 3x5 mL de diclorometano y se combinaron las capas orgánicas y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó mediante Prep-HPLC (CH₃CN/H₂O/FA). Esto dio como resultado 32.9 mg de 2-(3-bromo-5-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4- carboxamida (28 % de rendimiento) como un sólido blanco. ESI-MS *m/z* = 405.0 [M+H]⁺. MW calculado: 404.0. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.82 (s, 1H), 10.95 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 3.30 (s, 3H), 2.39 (s, 3H).

Los siguientes ejemplos se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

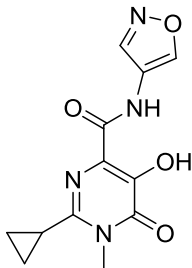
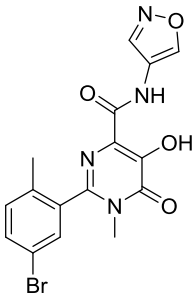
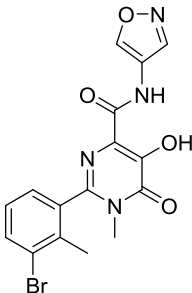
Tabla 3

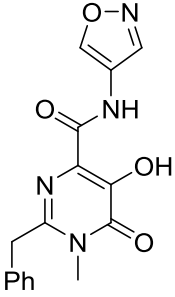
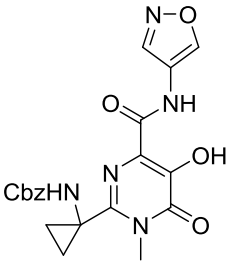
25

30

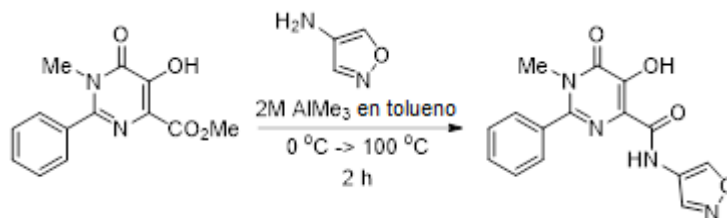
35

Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS	NMR
2		2-ciclobutil-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS <i>m/z</i> = 291.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 290.1	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ: 11.60 (s, 1H), 10.72 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 3.79-3.68 (m, 1H), 3.39 (s, 3H), 2.65-2.51 (m, 2H), 2.35-2.23 (m, 2H), 2.09-1.92 (m, 1H), 1.90-1.72

				(m, 1H).
3		2-ciclopropil-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 277.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 276.1	1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.52 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 3.64 (s, 3H), 2.20-2.22 (m, 1H), 1.27-1.16 (m, 2H), 1.06-0.94 (m, 2H).
4		2-(5-bromo-2-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 405.1[M+H] ⁺ . MW calculado: 404.0	1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 11.91 (s, 1H), 11.01 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.71 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.66-7.63 (m, 1H), 7.36 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 2.16(s, 3H).
5		2-(3-bromo-2-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 405.0 [M+H] ⁺ . MW calculado: 404.0	1H NMR (300 MHz, DMSO-d6) δ 11.93 (s, 1H), 10.98 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.85 (s, 1H), 7.82-7.79 (m, 1H), 7.52-7.49 (m, 1H), 7.33 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 2.26 (s, 3H).

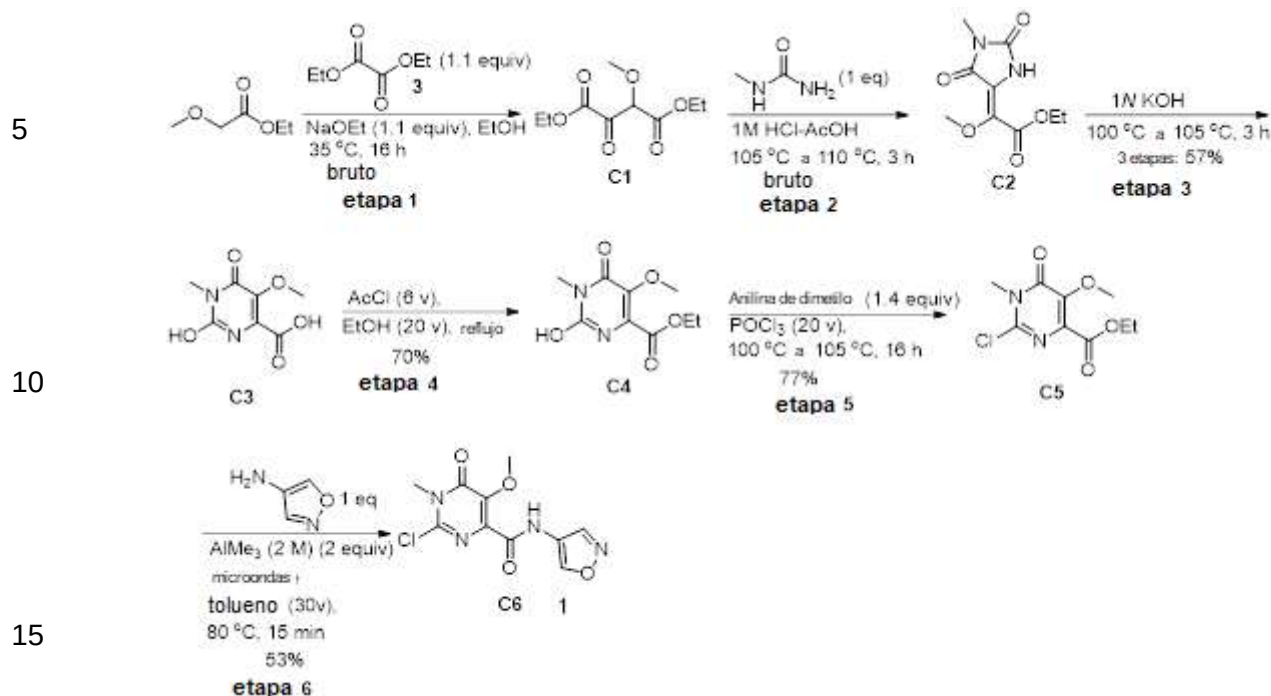
6		2-bencil-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 327.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 326.1	1H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 11.60 (s, 1H), 11.09 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 7.39-7.26 (m, 5H), 4.28 (s, 2H), 3.34 (s, 3H).
7		(1-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)ciclopropil)carbama to de bencilo	ESI-MS m/z = 426.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 425.1	1H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 11.66 (s, 1H), 10.65 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.33-7.10 (m, 5H), 4.97 (s, 2H), 3.57 (s, 3H), 1.74 (s, 2H), 1.16-1.12 (m, 2H).

Síntesis de 5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-fenil-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (Ejemplo 8).

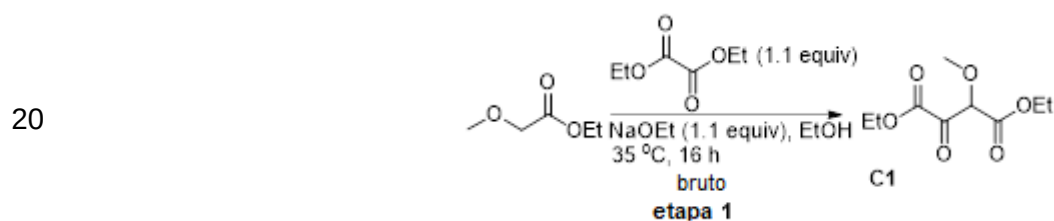


Se disolvieron 5-hidroxi-1-metil-6-oxo-2-fenil-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (200 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.) e isoxazol-4-amina (0.096 g, 1.15 mmol, 1.5 equiv.) en tolueno (1 mL) y la mezcla se enfrió a 0 °C. A esto se agregó trimetilaluminio 2 M en tolueno (0.768 ml, 1.53 mmol, 2.0 equiv.) gota a gota a 0 °C. Luego la mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 2 h y luego se inactivó con solución saturada de bicarbonato (0.2 ml) y a esta se agregó acetato de etilo (10 ml). Luego la mezcla de reacción se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se retiró por filtración. El sólido se lavó con acetato de etilo (3 x 10 mL) y la capa orgánica combinada se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante HPLC de fase inversa para obtener 5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-fenil-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida, 8 (25 mg, 15 %). ESI-MS m/z = 313.2 [M+H]⁺. MW calculado: 312.29. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 9.13 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 7.42-7.50 (m, 5H), 3.22 (s, 3H).

Esquema: Síntesis de 2-cloro-N-(isoxazol-4-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (C)

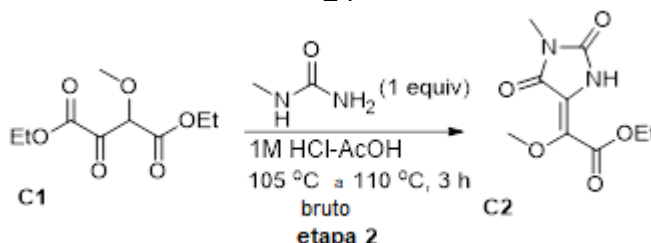


Etapas 1: Síntesis de 1,4-dietil 2-metoxi-3-oxobutanedioato (1)



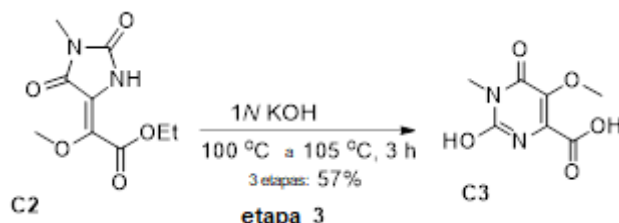
En un matraz de fondo redondo de 1000 mL y de 3 cuellos purgado y conservado con una atmósfera inerte de nitrógeno, se agregaron etanol (600.0 mL), etanolato de sodio (31.7 g, 0.470 mmol, 1.10 equiv.), oxalato de etilo (68.00 g, 465.6 mmol, 1.10 equiv.) a temperatura ambiente. Esto fue seguido por la adición de 2-metoxiacetato de etilo (50.00 g, 423.3 mmol, 1.00 equiv.) gota a gota con agitación a temperatura ambiente. La solución resultante se agitó durante 1 noche a 35 °C. La mezcla de reacción se concentró al vacío para retirar la mayoría del etanol. El valor de pH de la solución se ajustó a 3 con cloruro de hidrógeno (1 mol/L) a 0 °C. La solución resultante se extrajo con 4x500 mL de acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. Esto produjo 90 g (bruto) de 1,4-dietil-2-metoxi-3-oxobutanedioato (1) como aceite marrón.

Etapas 2: Síntesis de 2-metoxi-2-[(4E)-1-metil-2,5-dioxoimidazolidin-4-iliden]acetato de etilo (2)



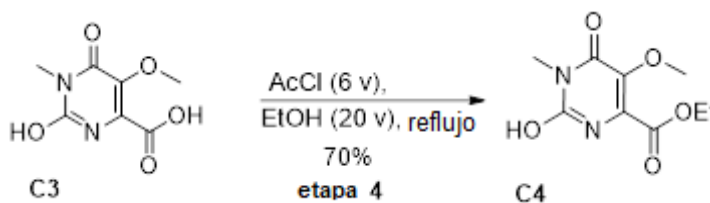
En un matraz de fondo redondo de 2000 mL, se colocaron 1,4-dietil 2-metoxi-3-oxobutanedioato (1) (90.00 g, 412.5 mmol, 1.00 equiv.), metilurea (30.60 g, 412.5 mmol, 1.00 equiv.), ácido acético (1200.0 mL), cloruro de hidrógeno (400.0 mL, gas, 4 mol en dioxano). La solución resultante se agitó durante 3 h a 105 °C. La mezcla resultante se concentró al vacío. La mezcla resultante se lavó con 1 x 500 ml de hexano. Esto dio como resultado 90 g (bruto) de 2-metoxi-2-[(4E)-1-metil-2,5-dioxoimidazolidin-4-iliden]acetato de etilo (2) como un sólido marrón. ^1H NMR (300 MHz, cloroformo-d) δ 8.75 (s, 1H), 7.47 (s, 0.4H), 5.09 (s, 2H), 4.51-4.30 (m, 3H), 3.85 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 3.07 (s, 1H), 2.14 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 1.45-1.42 (m, 2H), 1.42-1.37 (m, 3H).

Etapa 3. Síntesis de ácido 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxílico (3)



En un matraz de fondo redondo de 2000 mL se colocaron 2-metoxi-2-[(4E)-1-metil-2,5-dioxoimidazolidin-4-iliden]acetato (2) (80.00 g, 350.6 mmol, 1.00 equiv.), hidróxido de potasio (1 M en agua) (1400.0 mL). La solución resultante se agitó durante 3 h a 105 °C. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C con un baño de agua/hielo. El valor de pH de la solución se ajustó a 3 con cloruro de hidrógeno (12 mol/L) a 0 °C, los sólidos se recolectaron mediante filtración y el precipitado se secó al vacío. Esto dio como resultado 40 g de ácido 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxílico (3) (rendimiento de 57 %) como un sólido blanco. ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 14.35 (s, 1H), 10.91 (s, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.14 (s, 3H).

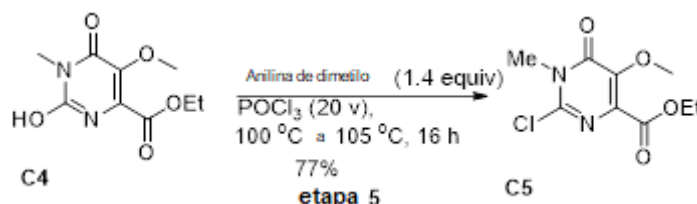
Etapa 4. Síntesis de 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (4)



En un matraz de fondo redondo de 1000 mL y de 3 cuellos purgado y conservado en una atmósfera inerte de argón, se colocaron ácido 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-

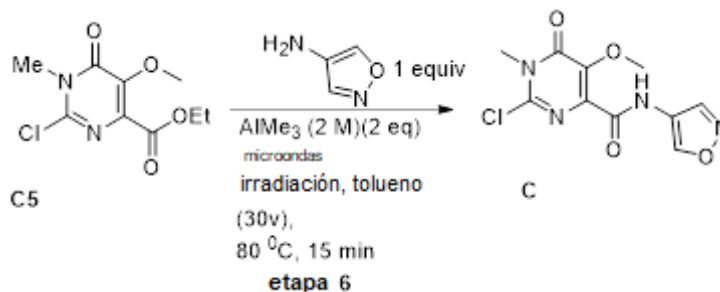
carboxílico (3) (20 g, 0.10 mmol, 1.00 equiv.) etanol (400.0 mL). Esto fue seguido por la adición de cloruro de acetilo (117.7 g, 1.500 mmol, 15.00 equiv.) gota a gota con agitación a 0 °C. La solución resultante se calentó a reflujo durante 1 noche. La mezcla de reacción se enfrió con un baño de agua/hielo. Los sólidos se recolectaron mediante filtración. Esto dio como resultado 16 g de 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (4) (rendimiento: 70 %) como un sólido blanco. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11.08 (s, 1H), 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.15 (s, 3H), 1.31 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Etapas 5. Síntesis de 2-cloro-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (5)



En un matraz de fondo redondo de 1 L y de 3 cuellos purgado y conservado en una atmósfera inerte de argón, se colocaron 2-hidroxi-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (4) (16.0 g, 70.1 mmol, 1.00 equiv.), dimetilalanilina (1.20 g, 98.2 mmol, 1.40 equiv.), tricloruro de fosforilo (320.0 mL). La solución resultante se agitó durante 1 noche a 100 °C. La mezcla resultante se concentró al vacío. Se aplicó el residuo a una columna de gel de sílice con acetato de etilo/éter de petróleo (1/10-1/4). Esto dio como resultado 13.3 g de 2-cloro-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (5) (rendimiento de 77.0 %) como un sólido amarillo. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

Etapas 6. Síntesis de 2-cloro-5-metoxi-1-metil-N-(1,2-oxazol-4-il)-6-oxopirimidin-4-carboxamida (6)



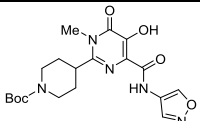
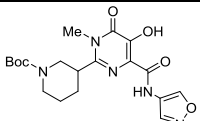
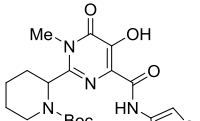
A una solución agitada de 2-cloro-5-metoxi-1-metil-6-oxopirimidin-4-carboxilato de etilo (5) (1.00 g, 4.05 mmol, 1.00 equiv.) y 1,2-oxazol-4-amina (340.9 mg, 4.050 mmol, 1.00 equiv.) en tolueno (15.0 mL) se le agregó trimetilaluminio (2 mol en tolueno) (4.1 mL, 8.10 mmol, 2.00 equiv.) a temperatura ambiente en atmósfera de argón. La solución resultante se agitó con radiación por microondas durante 15 min a 80 °C. La mezcla de reacción se inactivó con agua/hielo a 0 °C. La solución resultante se extrajo con 3x40 ml de acetato de etilo,

las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (1x30 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Se aplicó el residuo a una columna de gel de sílice con acetato de etilo/éter de petróleo (1/10-1/1). Esto dio como resultado 650 mg de 2-cloro-5-metoxi-1-metil-N-(1,2-oxazol-4-il)-6-oxopirimidin-4-carboxamida (6) (rendimiento de 53.0 %) como un sólido amarillo claro. ESI-MS m/z = 285.2 $[M+H]^+$. MW calculado: 284.2 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10.84 (s, 1H), 9.28 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.62 (s, 3H).

Los siguientes ejemplos e intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

Tabla 4

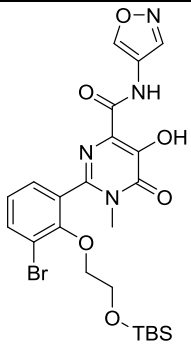
Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS	NMR
9		2-(2-bromofenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 393.2 $[M+H]^+$ MW calculado: 391.18	^1H NMR(400 MHz, DMSO- d_6): δ 12.01 (s, 1H), 11.07 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.83 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.67-7.68 (m, 1H), 7.62 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.53 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.20 (s, 3H).
10		2-(3-bromofenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 393.1 $[M+H]^+$ MW calculado: 391.15	(400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.83 (s, 1H), 11.03 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.77 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.31 (s, 3H).
11		2-(4-bromofenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 393.6 $[M+H]^+$ MW calculado: 391.18	^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11.81 (s, 1H), 11.18 (s, 1H), 9.30 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.63 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.32 (s, 3H).

5	12		4-(5-hidroxi-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 320.7 [M ⁺ -BOC] ⁺ . MW calculado: 419.44	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 11.57 (s, 1H), 10.57 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 4.11 (bs, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.04-3.07(m, 1H), 2.86 (bs, 2H), 1.84 (bs, 4H), 1.43 (s, 9H).
10	13		3-(5-hidroxi-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 420.7 [M+H] ⁺ . MW calculado: 419.44	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 11.53 (s, 1H), 10.51 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 4.02-4.11 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.18-3.24 (m, 1H), 2.89-2.91 (m, 1H), 2.00-2.07 (m, 1H), 1.70-1.95 (m, 3H), 1.48-1.51 (m, 1H), 1.41 (s, 9H).
20	14		2-(5-hidroxi-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 420.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 419.44	¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆): δ 11.35 (s, 1H), 10.22 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 5.08 (s, 1H), 3.55-3.62 (m, 1H), 3.48 (s, 3H), 3.30 (bs, 1H), 2.19 (bs, 1H), 1.86 (bs, 2H), 1.59 (bs, 2H), 1.46 (bs, 1H), 1.32 (s, 9H).

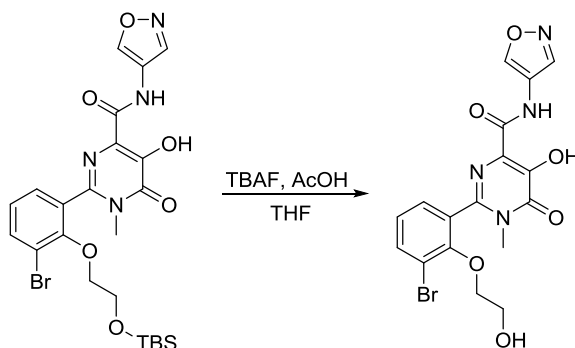
El siguiente intermedio se sintetizó usando condiciones similares a las descritas anteriormente junto con los materiales de partida adecuados.

Tabla 5

Intermedio	Estructura	Nombre	LCMS	NMR
------------	------------	--------	------	-----

C1		2-(3-bromo-2-(2- ((terc- butildimetilsilil)oxi)et oxi)fenil)-5-hidroxi- N-(isoxazol-4-il)-1- metil-6-oxo-1,6- dihidropirimidin-4- carboxamida	ESI-MS m/z = 451.0 [M+H] ⁺ . MW calculado: 450.0	¹ H NMR (300 MHz, DMSO-d ₆) δ 11.87 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.63 (t, J =5.4 Hz, 1H), 4.01-3.97 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.52- 3.39 (m, 2H), 3.23 (s, 3H).
-----------	---	--	---	--

Síntesis de 2-(3-bromo-2-(2-hidroxi)etoxi)fenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (Ejemplo 15).



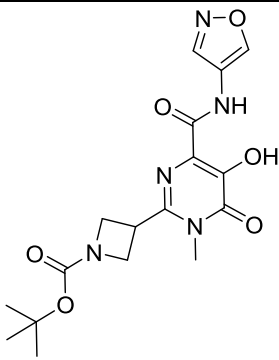
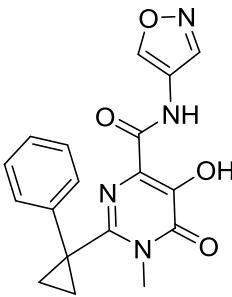
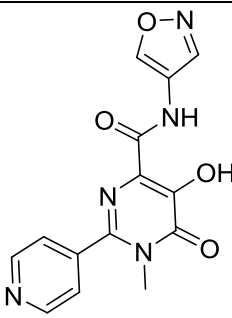
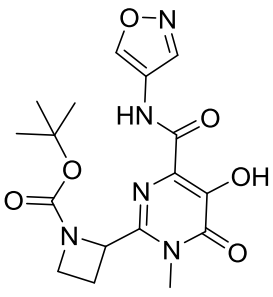
A un vial de 40 mL se le agregaron 2-(3-bromo-2-(2-((terc-butildimetilsilil)oxi)etoxi)fenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (300 mg, 0.531 mmol, 1.0 equiv.) y THF (6.0 mL) a temperatura ambiente. A la mezcla anterior se le agregó TBAF(1M)/CH₃COOH =1:1 (1.20 mL, 2.0 equiv.) gota a gota durante 2 min a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 5 h adicionales a temperatura ambiente. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (1x12 mL). La fase acuosa se extrajo adicionalmente con acetato de etilo (3 x10 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (2 x 7 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro. Después de la filtración, se concentró el filtrado a presión reducida. El producto bruto (300 mg) se purificó mediante Prep-HPLC (acetonitrilo/ácido fórmico/agua) para proporcionar 70 mg de 2-(3-bromo-2-(2-hidroxi)etoxi)fenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida, **15**, en 29 % de rendimiento como un sólido blanco. ESI-MS m/z = 451.0 [M+H]⁺. MW calculado: 450.0. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 11.87 (s, 1H), 10.99 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 7.85 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.28 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.63 (t, J =5.4 Hz, 1H), 4.01-3.97 (m, 1H), 3.76-3.70 (m, 1H), 3.52-3.39 (m, 2H), 3.23 (s, 3H).

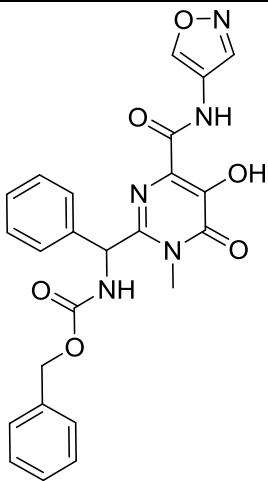
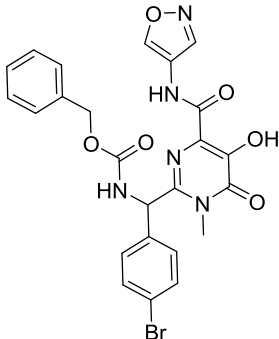
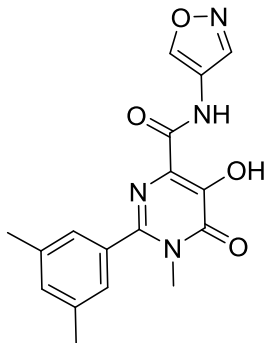
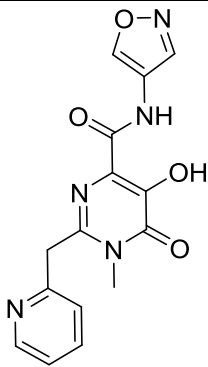
Los siguientes ejemplos e intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas

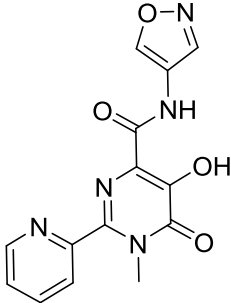
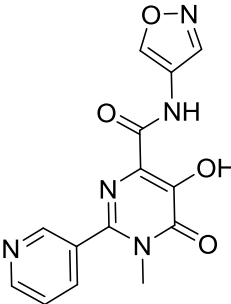
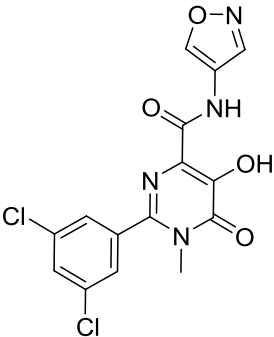
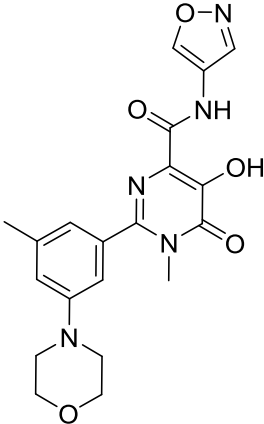
en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

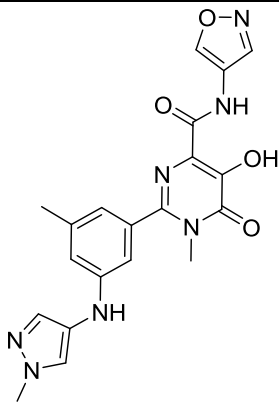
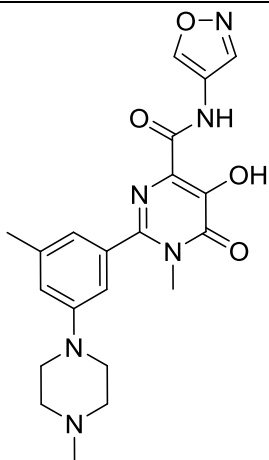
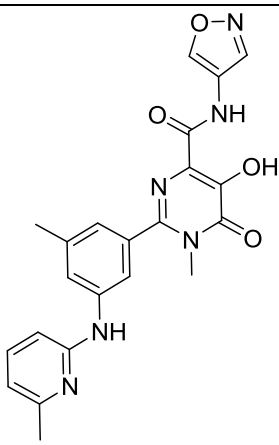
Tabla 6

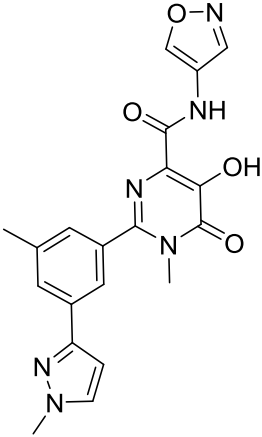
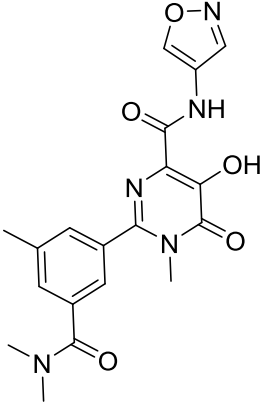
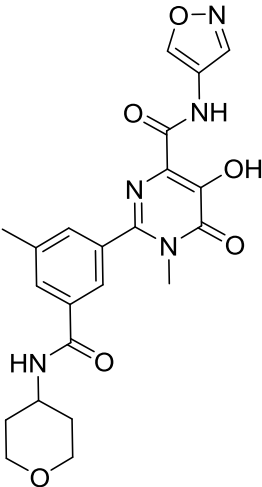
Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS
16		3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 406.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 405.4
17		4-((5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 434.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 433.2
18		3-((5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)metil)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 434.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 433.2

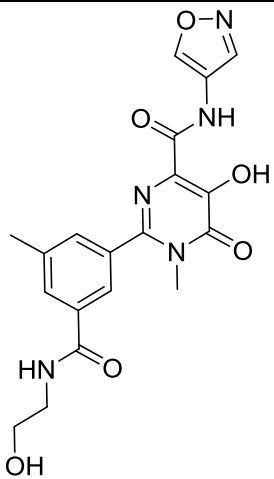
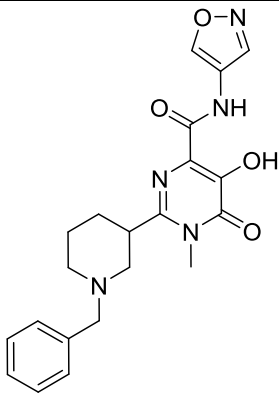
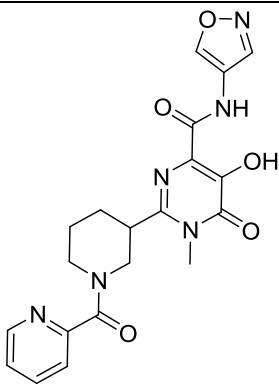
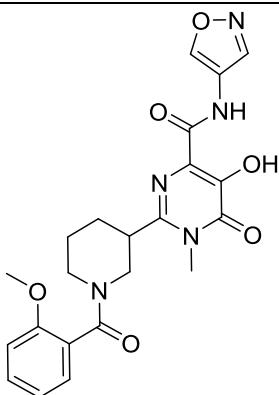
5	19		3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)azetidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 390.2 [M-H] ⁻ . MW calculado: 391.2
10	20		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenilciclopropil)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 353.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 352.1
15	21		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piridin-4-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 314.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 313.3
20	22		2-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)azetidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 392.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 391.1

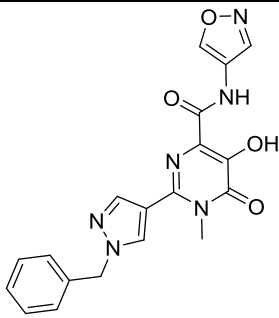
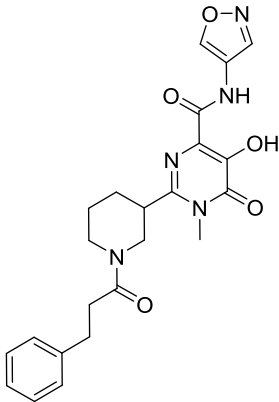
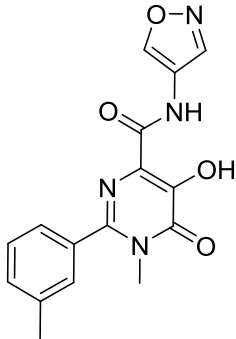
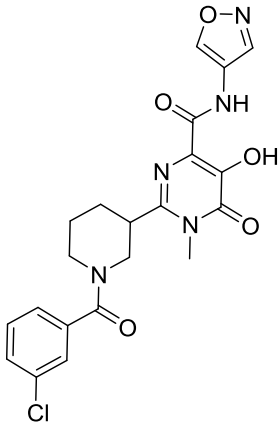
5	23		((5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)(fenil)metil)carbamato de bencilo	ESI-MS m/z = 476.3 [M+H]⁺. MW calculado: 475.5
10	24		((4-bromofenil)(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)metil)carbamato de bencilo	ESI-MS m/z = 555.1 [M+H]⁺. MW calculado: 554.4
15	25		2-(3,5-dimetilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 341.1 [M+H]⁺. MW calculado: 340.1
20	26		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piridin-2-ilmetil)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 328.2 [M+H]⁺. MW calculado: 327.3
25				
30				

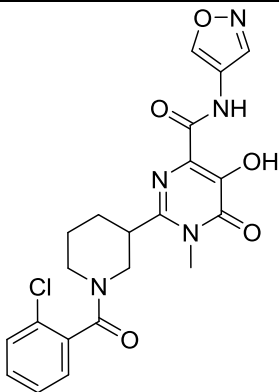
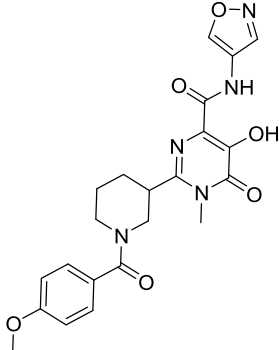
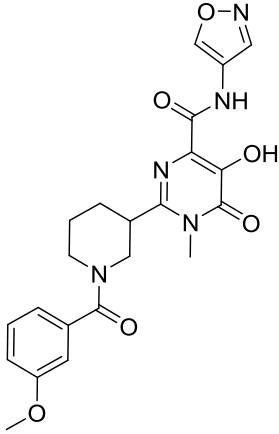
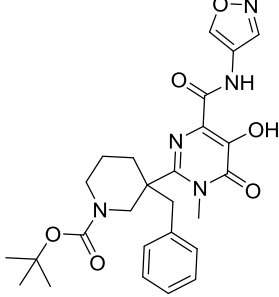
5	27		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piridin-2-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 314.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 313.3
10	29		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piridin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 314.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 313.3
15	30		2-(3,5-diclorofenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 381.0 [M+H] ⁺ . MW calculado: 380.0
20	31		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-morfolinofenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 412.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 411.2

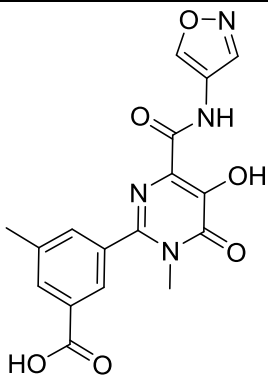
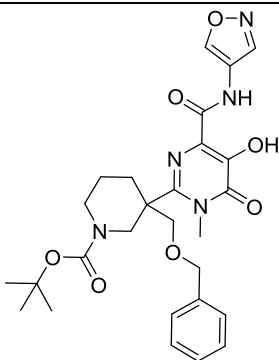
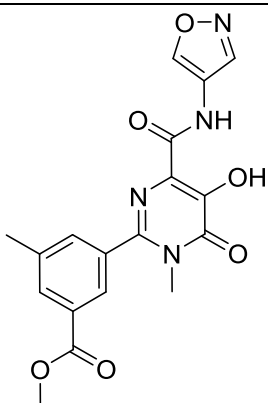
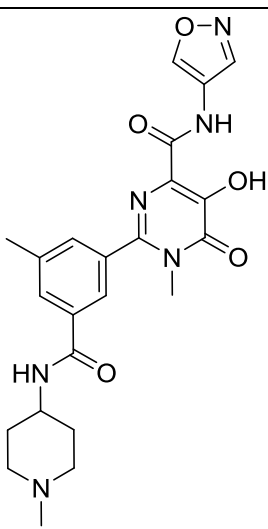
5	32		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-((1-metil-1H-pirazol-4-il)amino)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 422.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 421.2
10	33		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 424.2
20	34		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-((6-metilpiperidin-2-il)amino)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 433.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 432.2

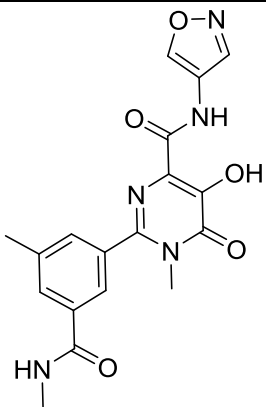
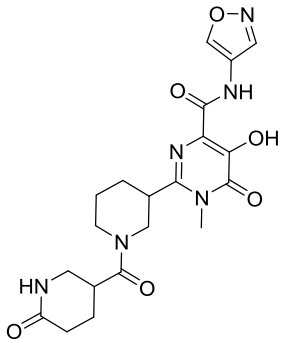
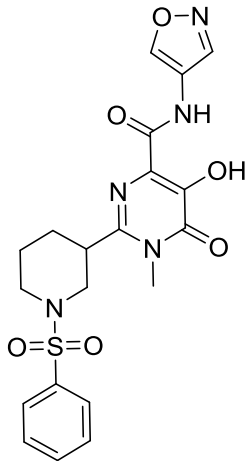
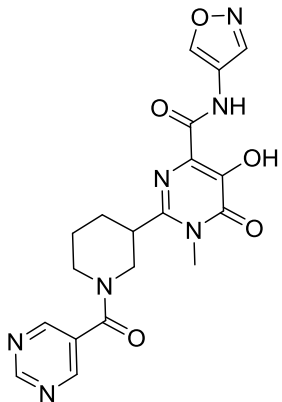
5	35		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-(1-metil-1H-pirazol-3-il)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 421.3[M+H] ⁺ . MW calculado: 420.2
10	36		2-(3-(dimetilcarbamoil)-5-metilfenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 398.2 [M+H] ⁺ . MW calculado= 397.1
20	37		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-((tetrahidro-2H-piran-4-il)carbamoil)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 454.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 453.2

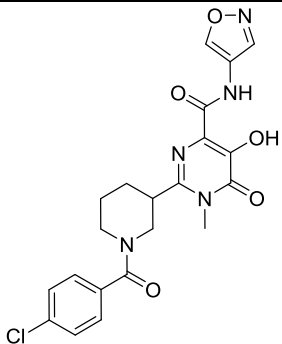
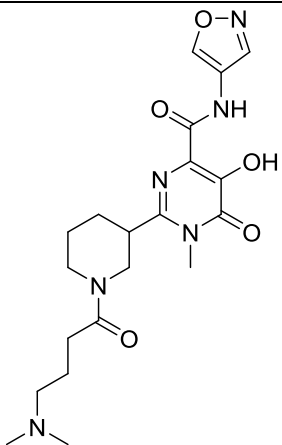
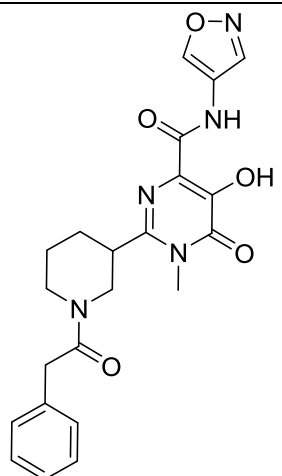
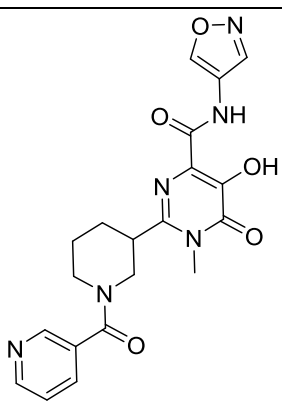
5	38		5-hidroxi-2-(3-((2-hidroxi-etil)carbamoil)-5-metilfenil)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 414.2 [M+H] ⁺ . MW calculado= 413.1
10				
15	39		2-(1-bencilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 410.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 409.5
20				
25	40		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-picolinoilpiperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 424.4
30				
35	41		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-2-(1-(2-metoxibenzoil)piperidin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 454.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 453.4

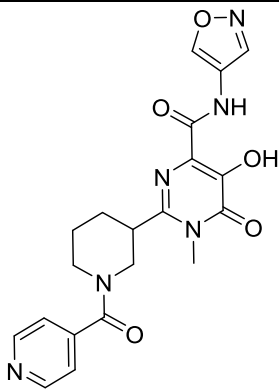
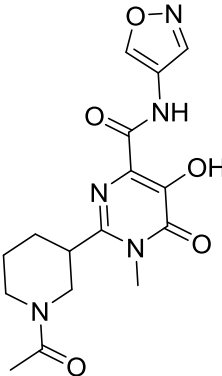
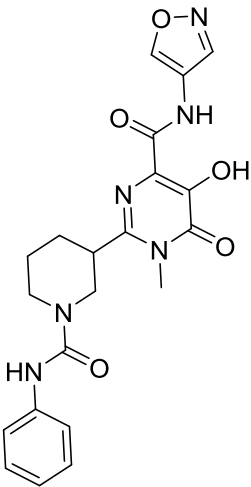
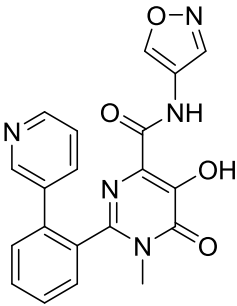
5	42		2-(1-bencil-1H-pirazol-4-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 393.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 392.4
10	43		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(3-fenilpropanoil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 452.7 [M+H] ⁺ . MW calculado: 451.5
20	44		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(m-tolil)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 327.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 326.3
25	45		2-(1-(3-clorobenzoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 458.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 457.9

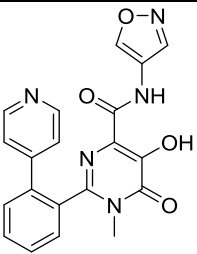
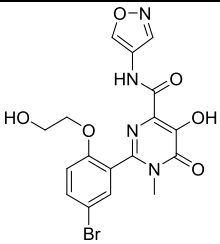
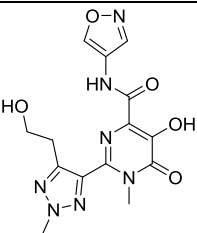
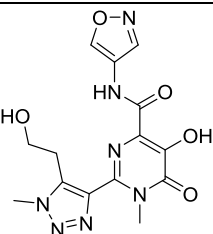
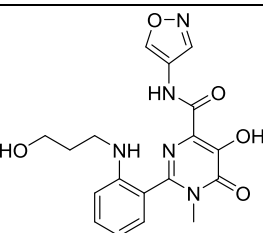
5	46		2-(1-(2-chlorobenzoyl)piperidin-3-yl)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 458.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 457.9
10	47		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-2-(1-(4-metoxibenzoil)piperidin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 454.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 453.4
20	48		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-2-(1-(3-metoxibenzoil)piperidin-3-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 454.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 453.4
30	50		3-bencil-3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 510.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 509.2

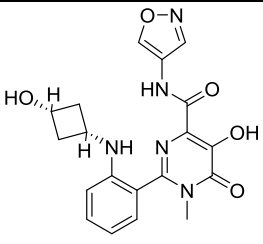
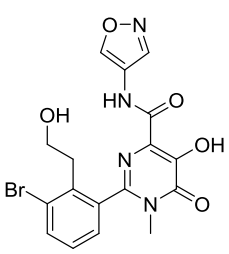
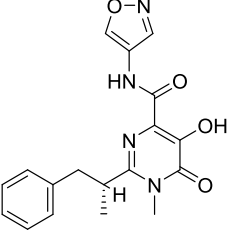
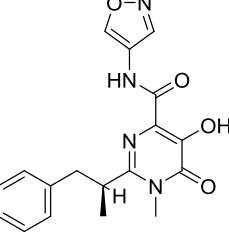
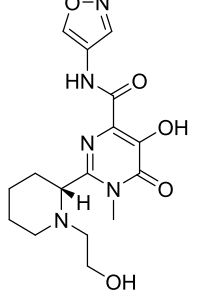
5	51		ácido 3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)-5-metilbenzoico	ESI-MS m/z = 371.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 370.1
10	52		3-((benciloxi)metil)-3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo	ESI-MS m/z = 540.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 539.2
20	53		3-(5-hidroxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoi)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)-5-metilbenzoato de metilo	ESI-MS m/z = 385.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 384.1
25	54		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-((1-metilpiperidin-4-il)carbamoi)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 467.2 [M+H] ⁺ . MW calculado= 466.2

5	55		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(3-metil-5-(metilcarbamoil)fenil)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 384.3 [M+H] ⁺ . MW calculado= 383.1
10	56		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(6-oxipiperidin-3-carbonil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 445.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 444.4
20	57		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(fenilsulfonil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 460.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 459.5
30	58		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(pirimidin-5-carbonil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 426.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 425.4

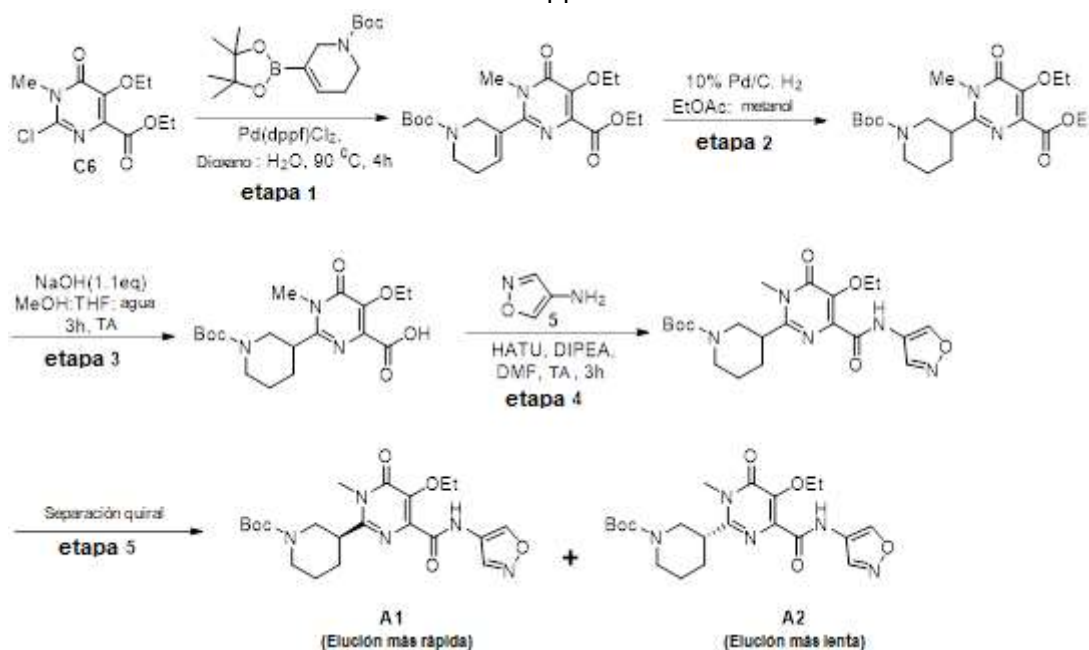
5	59		2-(1-(4-clorobenzoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 458.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 457.9
10	60		2-(1-(4-(dimetilamino)butanoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 433.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 432.5
20	61		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(2-fenilacetil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 438.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 437.5
30	62		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(1-(nicotinoil)piperidin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 424.4

5	63		5-hidroxi-2-(1-isonicotinoilpiperidin-3-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 424.4
10	64		2-(1-acetilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 362.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 361.4
20	65		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(fenilcarbamoil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 439.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 438.4
30	66		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-(piridin-3-il)fenil)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 390.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 389.4

5	67		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-(piridin-4-il)fenil)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 390.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 389.4
	68-69	Omitido intencionalmente		
10	70		2-(5-bromo-2-(2-hidroxi-etoxi)fenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 451.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 450.2
15	70-71	Omitido intencionalmente		
20	73		5-hidroxi-2-(5-(2-hidroxi-etil)-2-metil-2H-1,2,3-triazol-4-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 362.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 361.4
25	74		5-hidroxi-2-(5-(2-hidroxi-etil)-1-metil-1H-1,2,3-triazol-4-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 362.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 361.4
30	75		5-hidroxi-2-(2-((3-hidroxi-propil)amino)fenil)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 386.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 385.4

76		5-hidroxi-2-(2-(((1s,3s)-3-hidroxiciclobutil)amino)fenil)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 398.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 397.4
77	Omitido intencionalmente		
78		2-(3-bromo-2-(2-hidroxietil)fenil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 437.05 [M+H] ⁺ . MW calculado: 436.2
79		(R)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenilpropan-2-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 355.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 354.4
80		(S)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenilpropan-2-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 355.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 354.4
81	Omitido intencionalmente		
104		(R)-5-hidroxi-2-(1-(2-hidroxietil)piperidin-2-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 364.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 363.4

Síntesis de 3-(5-etoxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo (Isómero A1):



Etapas 1: 2-(1-(terc-butoxicarbonil)-1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo:

Una mezcla de 2-cloro-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo (2 g, 7.67 mmol), 5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-3,6-dihidropiridin-1(2H)-carboxilato de *terc*-butilo (2.96 g, 9.59 mmol) y carbonato de sodio (1.62 g, 15.34 mmol) en una solución de dioxano/agua (4:1, 50 mL) se desgasificó durante 20 minutos con gas argón. Se agregó PdCl₂(dppf) (0.561 g, 0.76 mmol) y se continuó la desgasificación durante otros 10 minutos. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C durante 4 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se absorbió en agua (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 50 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de columna, para obtener el compuesto del título (2.57 g, 82 %) como un sólido. LCMS: calculado 408.3; ESI-MS *m/z* = 408.61 [M+H]⁺ ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.23-1.31 (m, 6H), 1.43 (s, 9H), 2.25-2.40 (m, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.45-3.50 (m, 2H), 4.05-4.10 (m, 2H), 4.16 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.31 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.26 (bs, 1H).

Etapas 2: 2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo:

A una mezcla de 2-(1-(terc-butoxicarbonil)-1,2,5,6-tetrahidropiridin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo (2.57 g, 6.30 mmol) disuelta y agitada en una solución de metanol:acetato de etilo (1:3, 54 mL) se le agregó Pd/C al 10 % (0.67 g, con 50% de humedad). La reacción se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de gas hidrógeno durante 3.5 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se filtró a través de un lecho de celite y

se lavó con acetato de etilo (2 x 50 mL). Se concentró el filtrado a presión reducida. El producto bruto obtenido se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título (2.35 g, 91 %). LCMS: calculado 409.3, ESI-MS m/z = 410.4 $[M+H]^+$

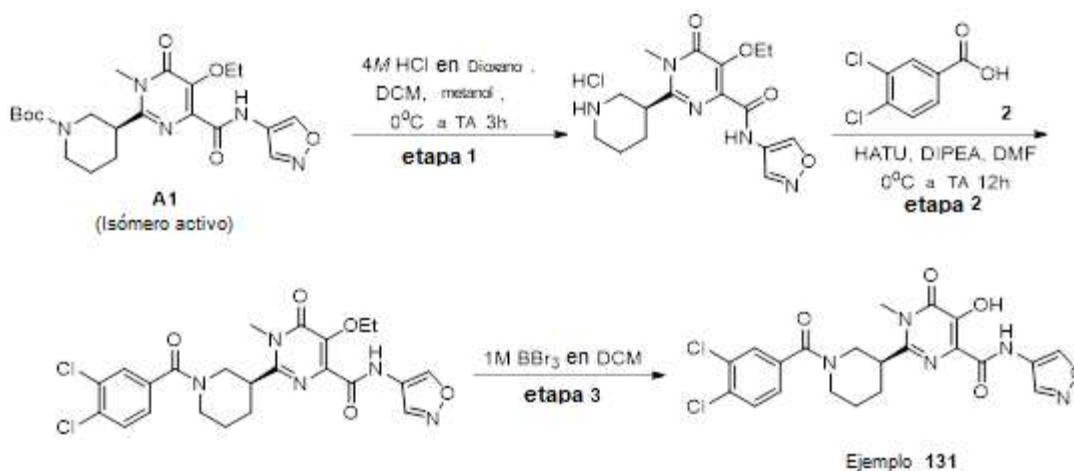
Etapas 3: ácido 2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxílico:

A una solución agitada de 2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo (1.9 g, 4.64 mmol) en una mezcla de metanol:THF:H₂O (1:1:1, 30 mL) se le agregó NaOH (0.222 g, 5.56 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Después de completarse la reacción, la reacción se concentró al vacío. La mezcla de reacción se disolvió en agua (10 mL) y se acidificó con HCl 1 N (pH-6). Se extrajo el producto con metanol al 10 % en diclorometano (2 x 30 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (30 mL) y se evaporó al vacío para proporcionar el compuesto del título bruto (1.67 g, 94 %), que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. LCMS: calculado 381.3; ESI-MS m/z = 382.5 $[M+H]^+$

Etapas 4: 3-(5-etoxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoyl)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de terc-butilo:

A una solución agitada de ácido 2-(1-(terc-butoxicarbonil)piperidin-3-il)-5-etoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxílico (1.67 g, 4.37 mmol) en DMF seco (16 mL) se le agregó HATU (2.49 g, 6.56 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se agregaron isoxazol-4-amina (0.441 g, 5.25 mmol) en DMF (0.5 mL) y DIPEA (1.5 mL, 8.75 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 30 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna Combiflash para proporcionar el compuesto del título (1.67 g, 85 %) como una mezcla racémica. La resolución quimérica del compuesto racémico puro (1.2 g) se realizó usando HPLC preparativa quiral para proporcionar 500 mg de cada enantiómero. LCMS: calculado 447.3; ESI-MS m/z = 448.60 $[M+H]^+$ HPLC quiral: CHIRALPAK AD-H; metanol al 30 % en CO₂ líquido + DEA al 0.1 %. FR-1 (Isómero-A1): R_T = 7.66 min; FR-2 (Isómero-A2): R_T = 8.81 min; A1: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.21-1.25 (m, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.46-1.57 (m, 2H), 1.71-1.74 (m, 2H), 2.02-2.04 (m, 1H), 2.76-2.98 (m, 2H), 2.99-3.15 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.85-4.15 (m, 1H), 4.10-4.15 (m, 2H), 8.78 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 10.56 (s, 1H). A2: ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.21-1.29 (m, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.46-1.57 (m, 2H), 1.71-1.74 (m, 2H), 2.02-2.04 (m, 1H), 2.78-2.98 (m, 2H), 2.99-3.15 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.85-4.15 (m, 1H), 4.10-4.15 (m, 2H), 8.78 (s, 1H), 9.29 (s, 1H), 10.57 (s, 1H).

Síntesis de carbonato de etilo de 1-((2-((R)-1-(3,4-diclorobenzoyl)piperidin-3-il)-4-(isoxazol-4-

ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-5-il)oxi)etilo. (EJEMPLO 131)**Etapas 1: Sal de clorhidrato de (R)-5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida:**

A una solución agitada de (R)-3-(5-etoxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (0.20 g, 0.44 mmol) en mezcla de diclorometano (1.32 mL) y metanol (0.66 mL) se le agregó HCl 4 M en dioxano (1 mL) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se calentó a 40 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se concentró hasta la sequedad y se destiló de forma azeotrópica dos veces con metanol para proporcionar el compuesto del título (0.17 g, 99 %) como un sólido, el cual se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS: calculado 347.3, ESI-MS $m/z = 348.48 [M + H]^+$

Etapas 2: (R)-2-(1-(3,4-diclorobenzoyl)piperidin-3-il)-5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida:

A una solución agitada de ácido 3,4-diclorobenzoico (0.101 g, 0.53 mmol) en DMF seco (1.7 mL) se le agregó HATU (0.252 g, 0.66 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se agregaron la sal de clorhidrato de (R)-5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (0.170 g, 0.44 mmol) y DIPEA (0.25 mL, 1.33 mmol) a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se agitó durante 3 h. Al completarse, la reacción se diluyó con agua (15 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 mL). La capa orgánica combinada se lavó con bicarbonato de sodio saturado frío (20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El producto bruto se purificó mediante cromatografía de columna para proporcionar un compuesto del título (0.21 g, 89 %) como un sólido. LCMS: Calculado 519.3, ESI-MS $m/z = 520.27 [M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.18-1.32 (m, 3H), 1.55-1.70 (m, 2H), 1.72-1.85 (m, 2H), 2.07-2.10 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.58 (s, 3H), 3.66-3.70 (m, 1H), 4.07-4.12 (m, 2H), 4.47-4.49 (m, 1H), 7.40-7.42(m, 1H), 7.70-7.73 (m,

2H), 8.74 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.52 (s, 1H).

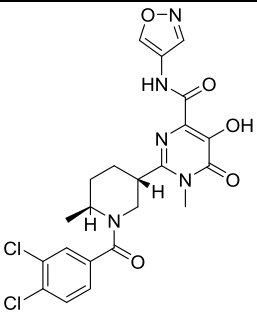
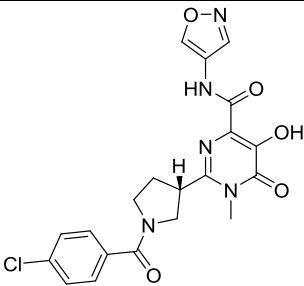
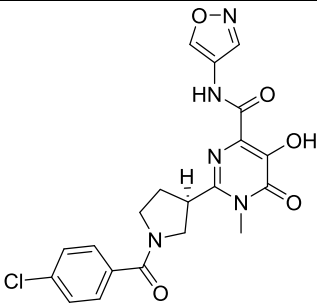
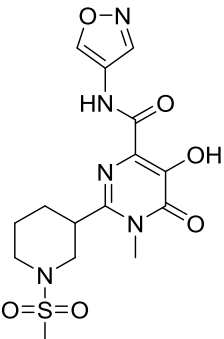
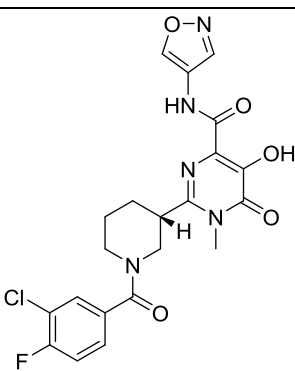
Etapla 3: (R)-2-(1-(3,4-diclorobenzoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidroxipirimidin-4-carboxamida:

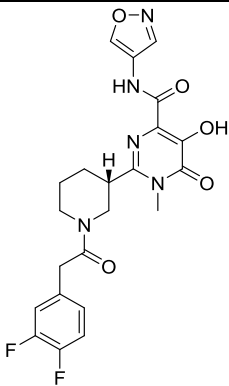
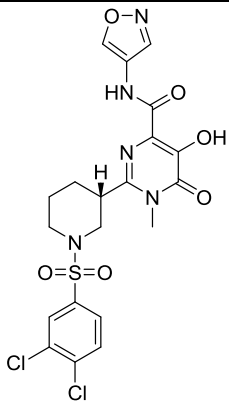
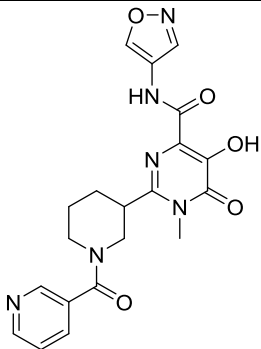
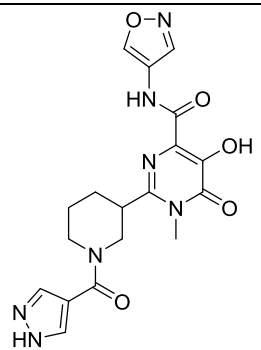
Una solución agitada de (R)-2-(1-(3,4-diclorobenzoil)piperidin-3-il)-5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidroxipirimidin-4-carboxamida (0.608 g, 1.16 mmol) se disolvió en diclorometano (36 mL). La solución resultante se enfrió a 0 °C y se le añadió BBr₃ 1 M en diclorometano (4.67 mL, 4.67 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 5 horas. Al completarse, la mezcla de reacción se concentró y se destiló de forma azeotrópica con diclorometano (2 x 6 mL). El residuo se enfrió a 0 °C y se agregó metanol (5 mL) lentamente. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta la sequedad. El residuo se destiló de forma azeotrópica con metanol (2 x 6 mL) para proporcionar el compuesto bruto. El compuesto bruto se cargó en celite y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa usando acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1 % en agua para proporcionar el Ejemplo 131 (0.246 g, 42 %). LCMS: Calculado 491.3, ESI-MS m/z = 492.3 [M+H]⁺. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.44-1.62 (m, 2H), 1.80-1.95 (m, 2H), 2.07-2.10 (m, 1H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.57 (s, 3H), 3.60-3.70 (m, 1H), 4.34-4.52 (m, 1H), 7.40-7.42(m, 1H), 7.70-7.74 (m, 2H), 8.84-8.90 (m, 1H), 9.30 (s, 1H), 10.42-10.55 (m, 1H), 11.48 (s, 1H).

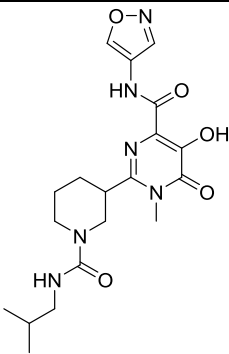
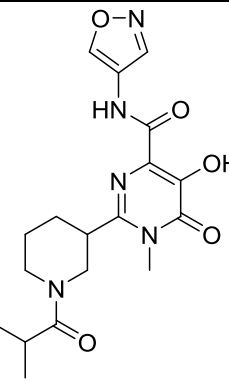
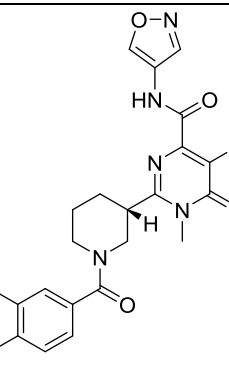
Los siguientes ejemplos e intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

Tabla 7

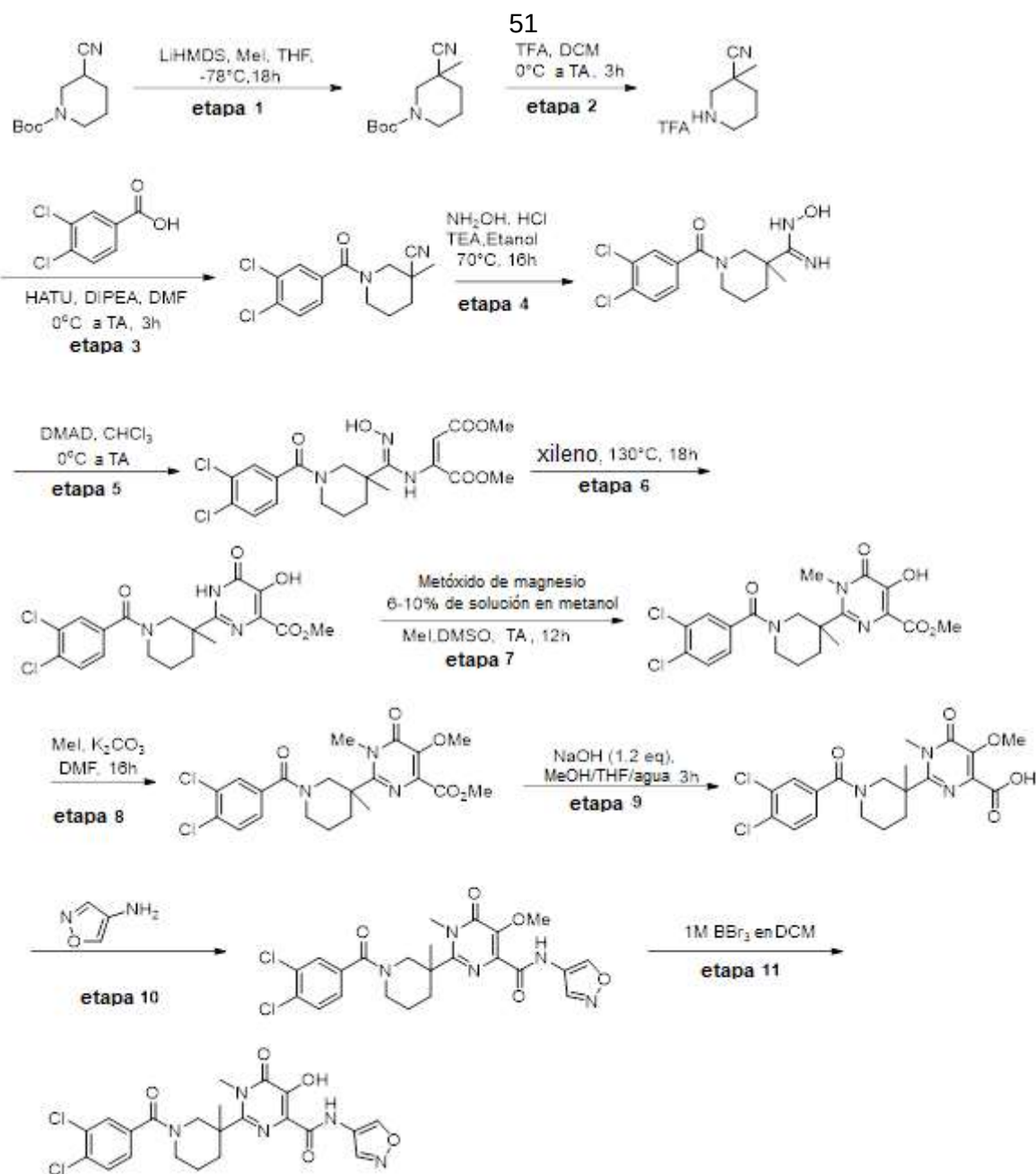
Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS
82		2-((1S,3R)-3-(3,4-diclorobenzamido)ciclohexil)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 507.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 506.4
83		2-((3S,6R)-1-(3,4-diclorobenzoil)-6-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 506.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 505.1

5	84		2-((3S,6S)-1-(3,4-diclorobenzoil)-6-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 506.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 505.1
10	85		(S)-2-(1-(4-clorobenzoil)pirrolidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 444.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 443.8
15	86		(R)-2-(1-(4-clorobenzoil)pirrolidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 444.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 443.8
20	87		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(1-(metilsulfonil)piperidin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 396.3 [M-H] ⁺ . MW calculado: 397.1
30	88		(S)-2-(1-(3-cloro-4-fluorobenzoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 476.3 [M-H] ⁺ . MW calculado: 475.9
35	89-90	Omitido intencionalmente		

5	91		(S)-2-(1-(2-(3,4-difluorofenil)acetil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 474.3 [M-H]⁺. MW calculado: 473.4
10	92		(S)-2-(1-((3,4-diclorofenil)sulfonil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 528.4 [M-H]⁺. MW calculado: 527.4
15	93		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(1-nicotinoilpiperidin-3-il)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.3 [M-H]⁺. MW calculado: 424.4
20	94		2-(1-(1H-pirazol-4-carbonil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 414.4 [M+H]⁺. MW calculado: 413.4
25				
30				

95		5-hidroxi-2-(1-isobutirilpiperidin-3-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 419.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 418.5
96		5-hidroxi-2-(1-isobutirilpiperidin-3-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 390.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 389.4
97		(S)-2-(1-(3,4-diclorobenzoil)piperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 492.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 491.1

Síntesis de 2-(1-(3,4-diclorobenzoil)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida. (EJEMPLO 130)



Ejemplo 130

Etapa 1: 3-ciano-3-metilpiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo:

A una solución agitada de 3-cianopiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (5.0 g, 24 mmol) en THF seco (100 mL) se le agregó LiHMDS (30.9 mL, 1 M in THF, 30.9 mmol) a -78 °C. La mezcla de reacción se agitó a -78 °C durante 30 min. Luego se agregó MeI (2.22 mL, 35.7 mmol) a la misma temperatura. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se vertió en una mezcla de agua helada (100 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para proporcionar el compuesto del título puro (3.5

g, 65 %) ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.35 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.66-1.70 (m, 1H), 1.78-1.81 (m, 2H), 1.87-2.10 (m, 1H), 2.80 (s, 2H), 3.90-4.20 (m, 2H).

Etapla 2: Sal de TFA de 3-metilpiperidin-3-carbonitrilo.

A una solución agitada de 3-ciano-3-metilpiperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo (3.5 g, 15.6 mmol) en diclorometano (70 mL) se le agregó TFA (12.7 mL) gota a gota a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para proporcionar el compuesto bruto. El compuesto bruto se trituro con dietiléter para proporcionar el compuesto del título (3.0 g, 81 %) como una sal de TFA. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.40 (s, 3H), 1.63-1.69 (m, 2H), 1.76-1.81 (m, 1H), 1.91-2.06 (m, 1H), 2.82-2.89 (m, 1H), 3.01-3.09 (m, 1H), 3.19-3.22 (m, 1H), 3.56-3.59 (m, 1H), 9.20 (bs, 1H).

Etapla 3: 1-(3,4-diclorobenzoil)-3-metilpiperidin-3-carbonitrilo.

A una solución agitada de ácido 3,4-diclorobenzoico (2.88 g, 15.1 mmol) en DMF seco (15 mL) se le agregó HATU (7.18 g, 18.9 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se agregó DIPEA (7 mL, 38 mmol) gota a gota seguido de la adición de sal de TFA de 3-metilpiperidin-3-carbonitrilo (3.0 g, 12.6 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se diluyó con agua (30 mL) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 200 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (50 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título puro (2.8 g, 56 %). LCMS: Calculado 296.3, ESI-MS m/z = 297.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapla 4: 1-(3,4-diclorobenzoil)-*N*-hidroxi-3-metilpiperidin-3- carboximidamida:

A una mezcla de 1-(3,4-diclorobenzoil)-3-metilpiperidin-3-carbonitrilo (4 g, 13.5 mmol), clorhidrato de hidroxilamina (2.80 g, 40.4 mmol) en etanol (100 mL) se le agregó lentamente trietilamina (5.8 mL, 40.4 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción resultante se calentó a 70 °C durante 16 h, luego se concentró, se diluyó con agua (100 mL) y se extrajo con metanol al 10 % en diclorometano (2 x 150 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título (5.0 g, 69 %) como un sólido. El producto bruto se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS: Calculado 329.3, ESI-MS m/z = 330.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Etapla 5: 2-((*E*)-1-(3,4-diclorobenzoil)-*N'*-hidroxi-3-metilpiperidin-3-carboximidamido)maleato de dimetilo:

A una solución agitada de 1-(3,4-diclorobenzoil)-*N*-hidroxi-3-metilpiperidin-3- carboximidamida (5.0 g, 15 mmol) en cloroformo (100 mL) se le agregó acetilendicarboxilato de dimetilo (3.32 g, 23.4 mmol) gota a gota a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la

noche. La reacción se controló mediante TLC y luego se concentró para proporcionar producto bruto que se purificó mediante cromatografía de columna en gel de sílice para obtener el compuesto del título puro (2.4 g, 33 %) como un sólido. LCMS: Calculado 471.2, ESI-MS m/z = 472.3 $[M+H]^+$.

5 **Etapla 6: 2-(1-(3,4-diclorobenzoi)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo.**

Se calentó una solución de 2-((E)-1-(terc-butoxicarbonil)-N'-hidroxipiperidin-3-carboximidamido)maleato de dimetilo (2.0 g, 4.2 mmol) en xilenos (15 mL) en un microondas a 160 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se concentró y se trituró con dietiléter y hexanos para
10 obtener un sólido. El residuo bruto se cargó en celite y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa usando acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1 % en agua para proporcionar el compuesto del título puro (0.40 g, 21 %). LCMS: Calculado 439.4, ESI-MS m/z = 440.5 $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.10 (s, 2H), 1.27 (s, 3H), 1.58-1.75 (m, 3H), 2.00-2.16 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.60-3.64 (m, 1H), 4.01 (bs, 1H), 7.26 (d, J = 8.4, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.67 (d, J
15 = 2.0 Hz, 1H), 10.36 (s, 1H), 12.40-12.65 (m, 1H).

Etapla 7: 2-(1-(3,4-diclorobenzoi)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo.

Se disolvió una mezcla de 2-(1-(3,4-diclorobenzoi)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (0.200 g, 0.454 mmol) en DMSO (50 mL) y se enfrió a 0 °C.
20 A esto, se le agregó solución metóxido de magnesio (1.30 mL, 0.908 mmol, 6 a 10 % en metanol) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró para retirar el exceso de metanol. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C y se le añadió MeI (0.116 mL, 1.81 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h, después se enfrió a 10 °C y se inactivó con HCl 1 N
25 lentamente. Se extrajo el producto con acetato de etilo (2 x 200 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo bruto se cargó en celite y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa usando acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1 % en agua para proporcionar el compuesto del título puro (0.20 g, 97 %). LCMS: Calculado 453.4, ESI-MS m/z = 454.2 $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.39 (s, 3H), 1.59 (bs, 1H), 1.75 (bs, 1H), 2.01-2.07 (m, 2H), 3.15-3.25 (m, 1H), 3.32-3.52 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.83-3.86 (m, 1H), 3.99-4.02 (m, 1H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 10.32 (s, 1H).
30

Etapla 8: 2-(1-(3,4-diclorobenzoi)-3-metilpiperidin-3-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo:

35 A una solución agitada de 2-(1-(3,4-diclorobenzoi)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-1-metil-6-oxo-1,6-

dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (0.20 g, 0.44 mmol) en DMF (1 mL) se le agregó K_2CO_3 (0.121 g, 0.875 mmol) seguido por la adición de MeI (0.042 mL, 0.660 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Después de completarse la reacción, se diluyó con agua (20 mL) y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar el compuesto del título puro (0.14 g, 67 %). LCMS: Calculado 467.4, ESI-MS m/z = 468.3 $[M+H]^+$

Etapas 9: Ácido 2-(1-(3,4-diclorobenzoyl)-3-metilpiperidin-3-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxílico:

A una solución agitada de 2-(1-(3,4-diclorobenzoyl)-3-metilpiperidin-3-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de metilo (0.140 g, 0.298 mmol) en una mezcla de metanol:THF:agua (1:1:1, 6 mL) se le agregó NaOH (0.014 g, 0.36 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Después de completarse la reacción, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida, se diluyó con agua helada (10 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 mL). La capa acuosa combinada se acidificó con HCl 1 N a 0 °C y se extrajo con metanol al 10 % en diclorometano (2 x 30 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (20 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para proporcionar el producto del título bruto. (0.130 g, 96 %). LCMS: Calculado 455.2, ESI-MS m/z = 456.6 $[M+H]^+$

Etapas 10: 2-(1-(3,4-diclorobenzoyl)-3-metilpiperidin-3-il)-N-(isoxazol-4-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida.

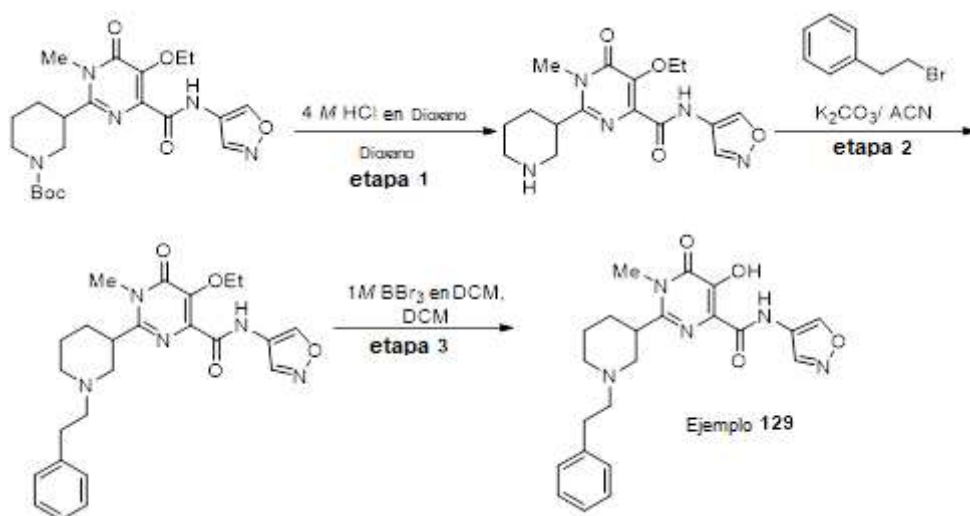
A una solución agitada de ácido 2-(1-(3,4-diclorobenzoyl)-3-metilpiperidin-3-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxílico (0.140 g, 0.308 mmol) en DMF seco (1.4 mL) se le agregó HATU (0.176 g, 0.462 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y después se agregaron DIPEA (0.17 mL, 0.99 mmol) e isoxazol-4-amina (0.038 g, 0.46 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, luego se diluyó con agua (20 mL) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 20 mL). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera (10 mL), se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía de columna para proporcionar el compuesto del título puro (0.135 g, 84 %) como un sólido. LCMS: Calculado 519.2, ESI-MS m/z = 520.4 $[M+H]^+$. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 1.16-1.19 (m, 3H), 1.19-1.23 (m, 2H), 1.42-1.56 (m, 2H), 3.32-3.52 (m, 2H) 3.62 (s, 3H), 4.01-4.02 (m, 1H), 4.03 (s, 3H), 4.70-4.77 (m, 1H), 7.25-7.27 (m, 1H), 7.59-7.67 (m, 2H), 8.74 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 10.58 (bs, 1H). HPLC quiral: CHIRALPAK AD-H; 30% (MeOH) en CO_2 líquido + DEA al 0.1

%: FR-1 (Isómero-1): $R_T=9.39$; FR-2 (Isómero-2): $R_T=14.82$.

Etapla-11: 2-(1-(3,4-diclorobenzoil)-3-metilpiperidin-3-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida.

Una solución agitada de 2-(1-(3,4-diclorobenzoil)-3-metilpiperidin-3-il)-N-(isoxazol-4-il)-5-metoxi-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida FR-1 (0.030 g, 0.057 mmol) disuelta en diclorometano (2 mL) se enfrió a 0 °C y se le agregó BBr_3 1 M en diclorometano (0.28 mL, 0.29 mmol) gota a gota. Luego la mezcla de reacción resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Al completarse la reacción, luego se concentró al vacío. Se agregó metanol (1 mL) y se agitó durante 30 min y se evaporó. El residuo se destiló de forma azeotrópica con metanol (2 x 1 ml) para proporcionar el compuesto bruto (120 mg). El residuo bruto se cargó en celite y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa usando acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1 % en agua para proporcionar el Ejemplo 130 (0.015 g, 51 %). LCMS: Calculado 505.2, ESI-MS $m/z = 506.3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1.35-1.45 (m, 3H), 1.46-1.60 (m, 2H), 1.70-1.80 (m, 2H), 3.15-3.18 (m, 2H), 3.38-3.44 (m, 2H), 3.61 (s, 3H), 7.22-7.24 (m, 1H), 7.59-7.64 (m, 2H), 8.73 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 10.75 (bs, 1H), 11.58 (bs, 1H).

Síntesis de 5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenetilpiperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (EJEMPLO 129)



Etapla 1: Sal de clorhidrato de 5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida:

A una solución agitada de 3-(5-etoxi-4-(isoxazol-4-ilcarbamoil)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-2-il)piperidin-1-carboxilato de *terc*-butilo [de la síntesis de **A1**] (0.35 g, 0.78 mmol) en mezcla de diclorometano (3 mL) y metanol (0.5 mL) se le agregó HCl 4 M en dioxano (3 mL) gota a gota a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y se calentó a 40 °C durante 10 min. La mezcla de reacción se concentró hasta sequedad y se destiló de forma

azeotrópica dos veces con metanol para proporcionar el compuesto del título como un sólido (0.290 g, 97 %), el cual se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS: Calculado 347.5; ESI-MS $m/z = 348.5 [M+H]^+$

Etapa 2: 5-etoxi-*N*-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenetilpiperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida:

A una solución agitada de sal de clorhidrato de 5-etoxi-*N*-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (0.050 g, 0.130 mmol) en DMF (0.5 mL) se le agregó trietilamina (0.055 mL, 0.391 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregó (2-bromoetil)benceno (0.024 g, 0.130 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h y luego se concentró. El producto bruto obtenido se trituro con hexanos (5 mL) y se secó al vacío para proporcionar el compuesto del título (0.050 g). El compuesto bruto del título se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional. LCMS: Calculado 451.3; ESI-MS $m/z = 452.4 [M+H]^+$

Etapa 3: 5-hidroxi-*N*-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenetilpiperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida:

Una mezcla de 5-etoxi-*N*-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-fenetilpiperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (0.05 g, 0.110 mmol) se disolvió en diclorometano (1 mL). La solución resultante se enfrió a 0 °C y se le añadió BBr₃ 1 M en diclorometano (0.22 mL, 0.22 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 h, luego se agregó bicarbonato de sodio saturado (0.5 mL) y se diluyó adicionalmente con metanol al 10 % en diclorometano. El residuo se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró hasta sequedad. El residuo bruto se cargó en celite y se purificó mediante cromatografía de columna de fase inversa usando acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1 % en agua para proporcionar el compuesto del título puro (0.01 g, 21 %). LCMS: Calculado 423.4; ESI-MS $m/z = 424.5 [M+H]^+$

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.60-1.80 (m, 4H), 1.85-1.95 (m, 1H), 2.66-2.70 (m, 2H), 2.70-3.02 (m, 6H), 3.48 (s, 3H), 7.18-7.28 (m, 5H), 8.77 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 10.25 (bs, 1H), 11.50 (bs, 1H).

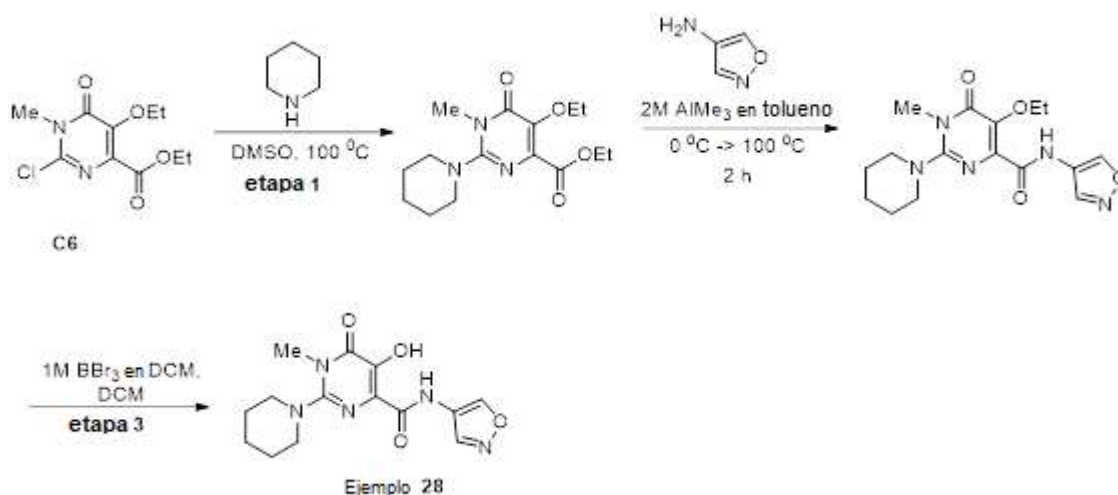
Los siguientes ejemplos e intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

Tabla 8

Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS
---------	------------	--------	------

98		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(1-(2,2,2-trifluoroetil)piperidin-3-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 402.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 401.3
99	Omitido intencionalmente		

Síntesis de 5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (EJEMPLO 28)



Etapla 1:

Se calentó una mezcla de **C6** (200 mg, 0.769 mmol), piperidina (0.76 ml, 7.69 mmol) y DMSO a 110 °C durante 1 h. El progreso de la reacción se controló mediante TLC y se enfrió a temperatura ambiente al consumirse el **C6**. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla de agua helada (25 ml) y se agitó bien durante 15 min. El material sólido se retiró por filtración, se lavó con agua (3 x 10 ml) y se secó bien al vacío para proporcionar el producto puro como un sólido (172 mg, 72 %). ESI-MS m/z = 310.38 [M+H]⁺ MW calculado: 309.37¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 4.00 (q, 2H), 4.26 (q, 2H), 3.38 (s, 3H), 3.04-3.06 (m, 4H), 1.57-1.62 (m, 6H), 1.20-1.30 (m, 6H).

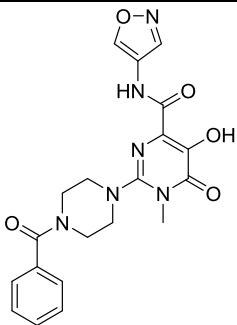
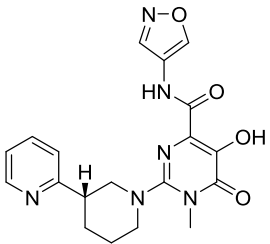
Etapla 2: A una solución agitada de 5-etoxi-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxilato de etilo (100 mg, 0.32 mmol), isoxazol-4-amina (35.3 mg, 0.42 mmol) en tolueno (1 mL) se le agregó aluminio de trimetilo 2 M en tolueno (0.6 ml, 0.64 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó hasta 80 °C durante 30 min con irradiación de microondas. La finalización de la

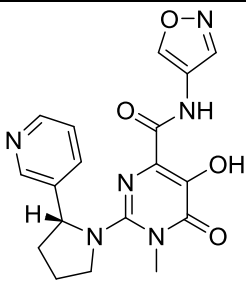
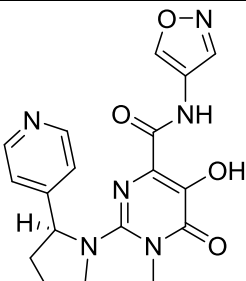
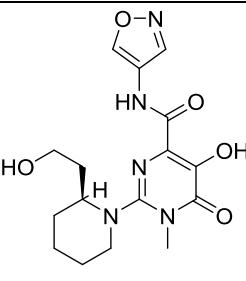
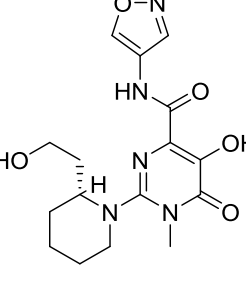
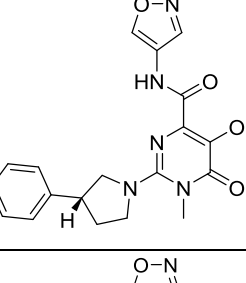
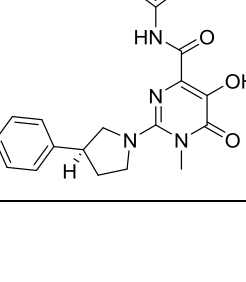
reacción se confirmó mediante TLC y la reacción se vertió en una mezcla de agua helada y se extrajo con acetato de etilo (2 x 10 ml). La capa orgánica se lavó con salmuera (2 x 10 mL). La capa orgánica combinada se secó sobre Na₂SO₄ y se evaporó al vacío para obtener el compuesto bruto como un sólido marrón claro (104 mg). El material bruto se utilizó en la siguiente etapa sin ninguna purificación. ESI-MS m/z = 348.5 [M+H]⁺ MW calculado: 347.3

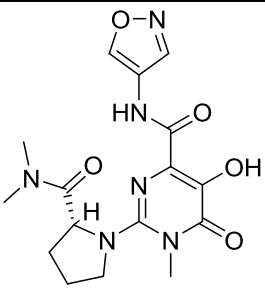
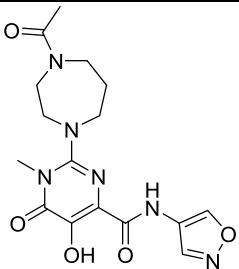
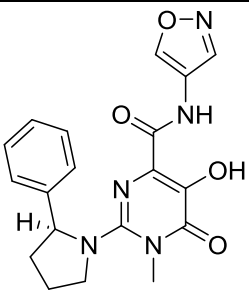
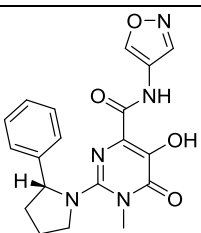
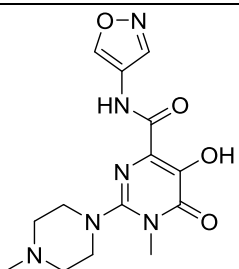
Etap 3: Se disolvió 5-etoxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (100 mg, 0.28 mmol) en diclorometano (1 mL). La solución resultante se enfrió a 0 °C y se le añadió BBr₃ 1 M en diclorometano (0.5 mL, 0.57 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se controló mediante TLC (metanol al 10 % en diclorometano). Al completarse, se retiró el solvente al vacío. Se agregó agua helada al residuo y el sólido se retiró por filtración para obtener el producto bruto (83 mg). El producto bruto se purificó adicionalmente mediante RP-HPLC para proporcionar el **Ejemplo 28**, producto 5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(piperidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida (10 mg, 0.032 mmol, 11 %). ESI-MS m/z = 320.3 [M+H]⁺ MW calculado: 319.3 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 11.19 (s, 1H), 10.54 (s, 1H), 9.31(s, 1H), 8.92 (s, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.08 (s, 4H), 1.59-1.67 (m, 6H).

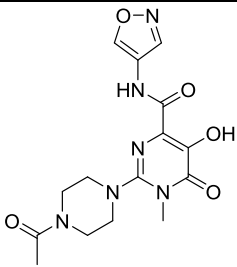
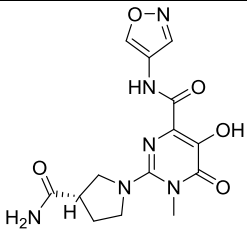
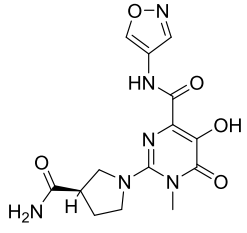
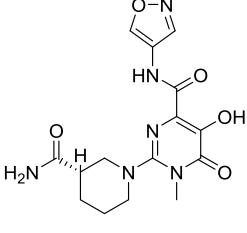
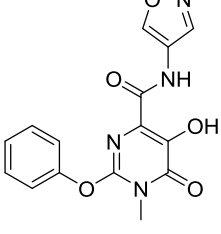
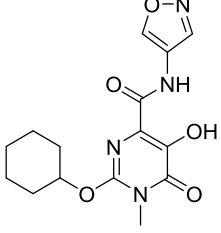
Los siguientes ejemplos e intermedios se sintetizaron usando condiciones similares a las descritas en la etapa anterior junto con los materiales de partida adecuados.

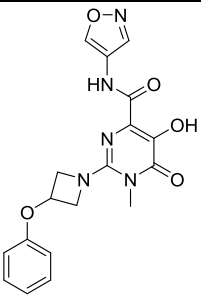
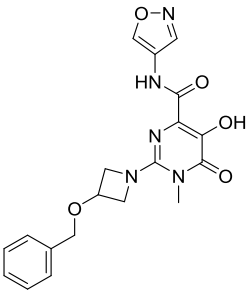
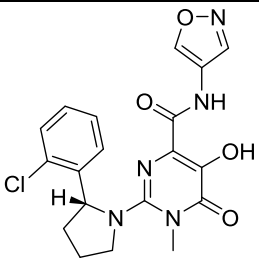
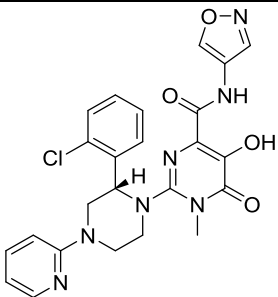
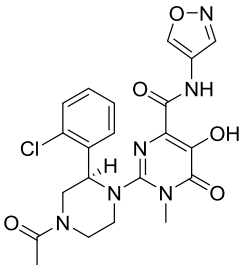
Tabla 9

Ejemplo	Estructura	Nombre	LCMS
100		2-(4-benzoylpiperazin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 425.6 [M+H] ⁺ . MW calculado: 424.4
101		(S)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(3-(piridin-2-il)piperidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 397.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 396.4

5	102		(R)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-(piridin-3-il)pirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 383.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 382.4
10	103		(S)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-(piridin-4-il)pirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 383.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 382.4
	105	Omitido intencionalmente		
15	106		(S)-5-hidroxi-2-(2-(2-hidroxi-etil)piperidin-1-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 364.5 [M+H] ⁺ . MW calculado: 363.4
20	107		(R)-5-hidroxi-2-(2-(2-hidroxi-etil)piperidin-1-il)-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 364.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 363.4
25	108		(R)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(3-fenilpirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 382.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 381.4
30	109		(S)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(3-fenilpirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 382.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 381.4
35				

5	110		(R)-2-(2-(dimetilcarbamoil)pirrolidin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 377.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 376.4
10	111		2-(4-acetil-1,4-diazepan-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 377.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 376.4
15	112		(S)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-fenilpirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 382.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 381.4
20	113		(R)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(2-fenilpirrolidin-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 382.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 381.4
25	49		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 335.4 [M+H] ⁺ . MW calculado: 334.4

5	116		2-(4-acetilpiperazin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 363.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 362.3
10	117		(S)-2-(3-carbamoilpirrolidin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 349.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 348.3
15	118		(R)-2-(3-carbamoilpirrolidin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 349.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 348.3
20	119		(S)-2-(3-carbamoilpiperidin-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 363.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 362.3
25	120		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-fenoxi-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 329.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 328.3
30	121		2-(ciclohexiloxi)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 335.1 [M+H] ⁺ . MW calculado: 334.3

5	122		5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-2-(3-fenoxiazetidín-1-il)-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 384.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 383.4
10	123		2-(3-(benziloxi)azetidín-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 398.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 397.4
15	124		(R)-2-(2-(2-clorofenil)pirrolidín-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 416.2 [M+H] ⁺ . MW calculado: 415.8
20	125		(S)-2-(2-(2-clorofenil)-4-(piridín-2-il)-piperazín-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 508.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 507.9
25	126-127	Omitido intencionalmente		
30	128		(R)-2-(4-acetil-2-(2-clorofenil)piperazín-1-il)-5-hidroxi-N-(isoxazol-4-il)-1-metil-6-oxo-1,6-dihidropirimidin-4-carboxamida	ESI-MS m/z = 473.3 [M+H] ⁺ . MW calculado: 472.9

Ensayos bioquímicos

1. Silenciamiento de TREX1 en células tumorales

La activación de la vía cGAS/STING al detectar el ADN citosólico y la producción posterior de IFN de tipo I puede ocurrir en tanto células tumorales como células inmunes innatas, particularmente

células dendríticas. Para evaluar si TREX1 mantiene controlada la producción de IFN de tipo I mediante un modelo tumoral singenérico frío bien descrito que se somete a al rechazo mediado por inmunidad al activarse el IFN de tipo I por parte de agonistas STING, el TREX1 se silenció en células tumorales B16F10 usando CRISPR (**Figura 1A**). La acumulación de ADN citosólico mediante transfección de ADN de las células tumorales dio como resultado un aumento de 5 veces en la producción de IFN β por parte de las células B16F10 con inactivación de TREX1 con respecto a las células tumorales parentales, lo que demostró que el TREX1 atenuó la activación de la vía GAS/STING en células tumorales B16F10 (**Figura 1B**).

2. Crecimiento de células tumorales B16F10 con competencia o deficiencia de TREX1 in vivo

Se evaluó el crecimiento de células tumorales B16F10 con competencia o deficiencia de TREX1 in vivo. Se inocularon ratones C57BL/6J por vía subcutánea en el costado derecho con 300,000 células tumorales B16F10 con inactivación de TREX1 o parentales. Se recopilaron los pesos corporales dos veces por semana y las mediciones tumorales dos o tres veces por semana, comenzando cuando los tumores se tornaron medibles y durante el resto de la duración del estudio. Los tumores en los cuales TREX1 se silenció presentaron volúmenes notablemente menores que los tumores B16F10 parentales (**Figura 2**).

Los tumores se recogieron el día 19, al terminar el estudio, y se digirieron en suspensiones de células únicas para permitir la cuantificación de citometría de flujo de poblaciones inmunes que infiltran tumores. Se descubrió que los tumores B16F10 con inactivación de TREX1 exhiben un aumento significativo en células inmunitarias generales, que reflejaron un aumento en la cantidad de linfocitos T CD8 y CD4 que infiltran tumores así como en células dendríticas plasmocitoides (pDC) (**Figura 3**). Se sabe que las pDC juegan un papel central en la inducción de respuestas inmunitarias anti-tumorales específicas para el antígeno mientras que se sabe que los linfocitos T son efectores importantes de eficacia anti-tumoral en ratones y humanos. El profundo cambio en el infiltrado inmunitario de los tumores con deficiencia de TREX1 entonces sugiere que la inhibición del crecimiento de estos últimos tumores está al menos en parte mediada por la inmunidad.

Ensayo bioquímico de TREX1

La potencia del compuesto se evaluó a través de un ensayo de fluorescencia que mide la degradación de un sustrato de ADNcd a medida que posee un par de inactivador-fluoróforo en cadenas opuestas. La degradación del ADNcd libera fluoróforo libre para producir una señal fluorescente. Específicamente, 7.5 μ L de TREX1 humano de longitud completa etiquetado con His-Tev en el extremo N (expresado en *E. coli* y purificado internamente) en amortiguador de reacción (Tris 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, DTT 2 mM, 0.1 mg/mL de BSA, Tween-20 al 0.01 % (v/v) y MgCl₂ 100 mM se agregaron a Black ProxiPlate Plus (Perkin Elmer) de 384 pocillos que ya

contenía compuesto (150 nL) en concentraciones diversas como una respuesta a la dosis de 10
 puntos en DMSO. A esto se le agregó 7.5 µL de sustrato de ADNcd (Cadena A: 5' TEX615/GCT
 AGG CAG 3'; Cadena B: 5' CTG CCT AGC/IAbRQSp (Integrated DNA Technologies)) en
 amortiguador de reacción. Las concentraciones finales fueron de TREX1 150 pM, sustrato de
 5 ADNcd 60 nM en amortiguador de reacción con DMSO al 1.0 % (v/v). Después de 25 minutos a
 temperatura ambiente, las reacciones se inactivaron mediante la adición de 5 µL de amortiguador
 de detención (igual que con la reacción de amortiguador más EDTA 200 mM). Las concentraciones
 finales en la reacción inactivada fueron de TREX1 112.5 pM, ADN 45 nM y EDTA 50 mM en un
 volumen de 20 µL. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, las placas
 10 se leyeron en un láser obtenido de Envision (Perkin-Elmer), que midió la fluorescencia a 615 nm
 seguido de excitación con 570 nm de luz. Los valores de IC₅₀ se calcularon al comparar la
 fluorescencia medida a una relación de 615 nm con respecto a los pocillos de control inactivados
 previamente con amortiguador de detención (100 % de inhibición) y controles sin inhibidor (0 % de
 inhibición) usando ajustes de cuatro parámetros de cuadrados mínimos no lineal y Genedata o
 15 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Ensayo bioquímico de TREX2

La potencia del compuesto se evaluó a través de un ensayo de fluorescencia que mide la
 degradación de un sustrato de ADNcd a medida que posee un par de inactivador-fluoróforo en
 cadenas opuestas. La degradación del ADNcd libera fluoróforo libre para producir una señal
 20 fluorescente. Específicamente, 7.5 µL de TREX2 humano etiquetado con His-Tev en el extremo N
 (residuos M44-A279, expresado en *E. coli* y purificado internamente) en amortiguador de reacción
 (Tris 50 mM (pH 7.4), NaCl 150 mM, DTT 2 mM, 0.1 mg/mL de BSA, Tween-20 al 0.01 % (v/v) y
 MgCl₂ 100 mM) se agregaron a Black ProxiPlate Plus (Perkin Elmer) de 384 pocillos que ya
 contenía compuesto (150 nL) en concentraciones diversas como una respuesta a la dosis de 10
 25 puntos en DMSO. A esto se le agregó 7.5 µL de sustrato de ADNcd (Cadena A: 5' TEX615/GCT
 AGG CAG 3'; Cadena B: 5' CTG CCT AGC/IAbRQSp (IDT)) en amortiguador de reacción. Las
 concentraciones finales fueron de TREX2 2.5 nM, sustrato de ADNcd 60 nM en amortiguador de
 reacción con DMSO al 1.0 % (v/v). Después de 25 minutos a temperatura ambiente, las reacciones
 se inactivaron mediante la adición de 5 µL de amortiguador de detención (igual que la reacción de
 30 amortiguador más EDTA 200 mM). Las concentraciones finales en la reacción de mezcla
 inactivada fueron de TREX2 1.875 pM, ADN 45 nM y EDTA 50 mM en un volumen de 20 µL.
 Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente, las placas se leyeron en un
 láser obtenido de Envision (Perkin-Elmer), que midió la fluorescencia a 615 nm seguido de
 excitación con 570 nm de luz. Los valores de IC₅₀ se calcularon al comparar la fluorescencia
 35 medida a una relación de 615 nm con respecto a los pocillos de control inactivados previamente

con amortiguador de detención (100 % de inhibición) y controles sin inhibidor (0 % de inhibición) usando ajustes de cuatro parámetros de cuadrados mínimos no lineal y Genedata o GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

Los resultados se muestran en la Tabla 1. IC₅₀ de TREX1: A = <0.1 µM; B = 0.1 a 1 µM; C = 1 a 10 µM; D = >10 µM. IC₅₀ de TREX2: A = <1 µM, B = 1 a 10 µM, C = 10 a 100 µM, D = >100 µM.

Tabla 10

Ejemplo	IC ₅₀ de TREX1	IC ₅₀ de TREX2
1	A	B
2	B	C
3	B	C
4	B	B
5	A	B
6	B	C
7	B	C
8	B	C
9	B	C
10	A	B
11	B	C
12	C	C
13	B	C
14	B	B
15	A	A
16	B	C
17	C	C
18	B	C
19	C	D
20	B	C
21	C	D
22	C	C
23	B	B
24	B	D
25	B	B
26	C	C
27	D	D

5

10

15

20

25

30

35

28	B	C
29	C	C
30	B	B
31	B	B
32	B	B
33	B	C
34	B	B
35	B	B
36	B	C
37	B	C
38	B	C
39	C	C
40	B	B
41	B	C
42	B	C
43	A	B
44	B	C
45	A	B
46	B	C
47	B	B
48	B	B
49	B	C
50	B	C
51	B	B
52	B	B
53	B	B
54	B	C
55	A	B
56	B	C
57	B	C
58	B	B
59	B	B
60	C	C
61	B	B

5

10

15

20

25

30

35

62	B	B
63	B	B
64	B	C
65	B	B
66	B	C
67	C	C
70	A	B
73	B	C
74	C	C
75	D	D
76	B	C
78	A	B
79	A	B
80	A	B
82	C	C
83	C	C
84	A	B
85	B	C
86	B	C
87	C	C
88	A	B
91	B	C
92	B	C
93	B	B
94	B	C
95	B	C
96	B	C
97	A	A
98	B	C
100	B	C
101	B	C
102	B	C
103	B	C
104	C	D

106	B	C
107	A	B
108	A	C
109	A	C
110	B	C
111	B	C
112	A	B
113	A	B
116	B	C
117	B	C
118	A	C
119	B	C
120	A	B
121	A	B
122	B	C
123	B	C
124	A	B
125	A	A
128	A	A
129	D	D
130	B	B
131	A	A

Ensayo de células HCT116

Las células duales HCT116 (Invivogen, San Diego, CA, EUA) se derivan de la línea de células de carcinoma colorrectal HCT116 humano. Las células se seleccionaron para la integración estable de genes indicadores de luciferasa y SEAP, cuya expresión está bajo el control de 5 elementos de respuesta en tándem para NF-KB/AP1 y STAT1/STAT2, respectivamente. La línea celular se usó para controlar la inducción de interferón de tipo I y la señalización posterior al medir la actividad de la luciferasa Lucia secretada en el medio de cultivo.

Las células HCT116 se colocaron en una o más placas de 96 pocillos a 40,000 células/pocillo en 100uL de DMEM complementados con FBS al 10 % y Hepes 25mM (pH 7.2 – 7.5). Después de asentarse durante la noche, las células se trataron con TREX1i durante 4 h (la fracción máxima de DMSO fue de 0.1 %) antes de que 1 ug/mL de digestión de restricción pBR322/BstNI (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) se transfectara con Lipofectamina LTX (ThermoFisher, Grand

Island, NY, EUA), de acuerdo con las recomendaciones del manual del producto. En resumen, se diluyó lipofectamina LTX (0.35uL / pocillo) en OptiMEM (5 uL/pocillo). pBR322/BstNI (100 ng/pocillo) se diluyó en OptiMEM (5 uL/pocillo) antes de que se agregara reactivo Plus (0.1 uL/100 ng de ADN). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la mezcla de ADN se mezcló gota a gota con la lipofectamina LTX diluida. Después de 10 min de incubación adicional, se agregó la mezcla de transfección (10 uL/pocillo) a las células. Las células se mantuvieron a 37 °C durante 48 h antes de monitorear la actividad de luciferasa Lucia del medio de cultivo de células.

Si bien hemos descrito una cantidad de modalidades, es evidente que se pueden alterar nuestros ejemplos básicos para proporcionar otras modalidades que utilicen los compuestos y los métodos de la presente invención. Por lo tanto, se entenderá que el alcance de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y no por las modalidades específicas que han sido representadas a modo de ejemplo.

El contenido de todas las referencias (incluidas las referencias bibliográficas, patentes concedidas, solicitudes de patente publicadas y solicitudes de patente en trámite con la presente) que se citan a lo largo de la presente solicitud se incorporan de manera expresa a la presente en su totalidad mediante la referencia. Salvo que se establezca de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente tienen el significado que conoce habitualmente el experto en la técnica.

20

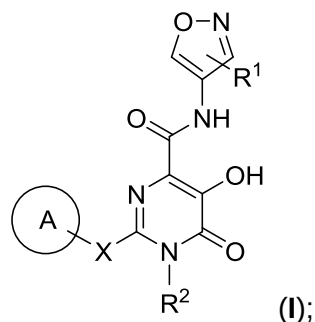
25

30

35

Listado de reivindicaciones:

1. Un compuesto que tiene la Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

R^1 es hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), cicloalquilo de 3 a 4 miembros, $-OR^f$, $-SR^f$ o $-NR^eR^f$;

R^2 es hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), o cicloalquilo de 3 a 4 miembros;

X es un enlace, NR^3 , O, S, o alquileno(C_1-C_4), en donde dicho alquileno(C_1-C_4) se sustituye opcionalmente con 1 a 2 grupos seleccionados de R^4 ;

R^3 es hidrógeno o alquilo(C_1-C_4), $-C(O)R^d$ o $-C(S)R^d$;

R^4 es halo, alquilo(C_1-C_4), fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-NHC(S)OR^a$, $-C(O)R^b$, $-NHC(O)NHR^g$, $-NHC(S)NHR^g$, $-NHS(O)_2NHR^g$, $-C(S)R^b$, $S(O)_2R^c$, $S(O)R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(S)OR^d$, $-C(O)NHR^e$, $-C(S)NHR^e$, $-NHC(O)R^d$, $-NHC(S)R^d$, $-OR^e$, $-SR^e$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$ o $-NR^eR^f$, en donde dicho fenilo para R^4 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4) y haloalcoxi(C_1-C_4);

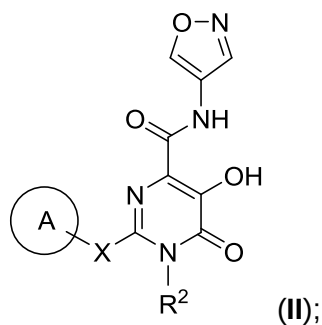
El anillo A es fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros, heterociclilo de 4 a 7 miembros, o cicloalquilo de 3 a 7 miembros, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^5 ;

R^5 es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-NHC(S)OR^a$, $-C(O)R^b$, $-NHC(O)NHR^g$, $-NHC(S)NHR^g$, $-NHS(O)_2NHR^g$, $-C(S)R^b$, $S(O)_2R^c$, $S(O)R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(S)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-C(S)NHR^e$, $-NHC(O)R^d$, $-NHC(S)R^d$, $-OR^e$, $-SR^e$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$, $-NR^eR^f$, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho fenilo para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de OR^h , $-NR^iR^k$, fenilo, y heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heterociclilo de 4 a 7 miembros y heteroarilo de 4 a 6 miembros, se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , y en donde dicho fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g ;

R^g , R^h , R^i , R^k y R^m son cada uno independientemente hidrógeno, halo, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), fenilo, -alquil(C_1-C_4)fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, y en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^g , R^h , R^i y R^k se sustituye además opcionalmente: con =O.

5 R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f son cada uno independientemente hidrógeno, halo, alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4), haloalcoxi(C_1-C_4), fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde i) dicho alquilo(C_1-C_4) para R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, $-OR^h$, $-NR^iR^k$; ii) dichos fenilo, heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g , y iii) dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^a , R^b , R^c , R^d , R^e y R^f se sustituye opcionalmente además con =O.

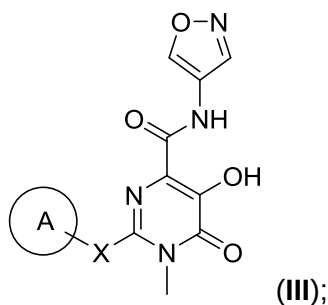
2. El compuesto de la Reivindicación 1, en donde el compuesto es de la Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

3. El compuesto de la Reivindicación 1 o 2, en donde R^2 es alquilo(C_1-C_4).

4. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, en donde el compuesto es de la Fórmula III:



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el anillo A es fenilo, piridilo, pirazolilo, ciclopropilo, ciclobutilo, azetidinilo o piperidinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con uno o dos R^5 .

35 6. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 4, en donde el anillo A es triazolilo,

pirrolidinilo, diazepanilo o piperazinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcional e independientemente con uno o dos R⁵.

7. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6, en donde R⁵ es alquilo(C₁-C₄), haloalquilo(C₁-C₄), haloalcoxi(C₁-C₄), halo, fenilo, -NHC(O)OR^a, -C(O)R^b, S(O)₂R^c, S(O)R^c, -C(O)OR^d, -C(O)NR^eR^f, -NHC(O)R^d, -OR^e, -Oalquilo(C₁-C₄)OR^e, -NR^eR^f, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho fenilo para R⁵ se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g, dicho alquilo(C₁-C₄) para R⁵ se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de OR^h, -NR^jR^k, fenilo, y heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros, se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m, y en donde dicho fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C₁-C₄) en R⁵ se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g;

R^a es alquilo(C₁-C₄) opcionalmente sustituido con fenilo;

- 15 R^b es alquilo(C₁-C₄), fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dicho alquilo(C₁-C₄) se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, -OR^h y -NR^jR^k, en donde dicho fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros y heterociclilo de 4 a 7 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g, y en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros se sustituye además
20 opcionalmente con =O;

cada R^c es independientemente fenilo o alquilo(C₁-C₄);

cada R^d es hidrógeno o alquilo(C₁-C₄);

cada R^e es independientemente hidrógeno o alquilo(C₁-C₄) opcionalmente sustituido con OR^h;

- 25 cada R^f es independientemente hidrógeno, alquilo(C₁-C₄), fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 5 a 6 miembros, en donde dichos fenilo, cicloalquilo de 3 a 4 miembros, heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 5 a 6 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con R^g;

- 30 cada R^g es independientemente alquilo(C₁-C₄), haloalquilo(C₁-C₄), alcoxi(C₁-C₄), haloalcoxi(C₁-C₄) o halo;

cada R^h es hidrógeno, alquilo(C₁-C₄) o alquil(C₁-C₄)fenilo;

cada R^j es independientemente hidrógeno o alquilo(C₁-C₄);

cada R^k es independientemente hidrógeno, alquilo(C₁-C₄) o cicloalquilo de 3 a 4 miembros;

y

- 35 cada R^m es alquilo(C₁-C₄).

8. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 7, en donde R^5 es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-C(O)R^b$, $S(O)_2R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-NHC(O)R^d$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$, $-NR^eR^f$, heteroarilo de 4 a 6 miembros o heterociclilo de 5 a 6 miembros, en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con $-OR^h$, fenilo, o heteroarilo de 5 a 6 miembros, dichos heteroarilo de 4 a 6 miembros y heterociclilo de 5 a 6 miembros se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , y en donde dichos fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g .
9. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 8, en donde R^5 es alquilo(C_1-C_4), haloalquilo(C_1-C_4), halo, fenilo, $-NHC(O)OR^a$, $-C(O)R^b$, $S(O)_2R^c$, $-C(O)OR^d$, $-C(O)NR^eR^f$, $-NHC(O)R^d$, $-Oalquilo(C_1-C_4)OR^e$, $-NR^eR^f$, morfolinilo, piperazinilo o pirazolilo, en donde dichos morfolinilo, piperazinilo y pirazolilo se sustituyen cada uno opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^m , dicho alquilo(C_1-C_4) para R^5 se sustituye opcionalmente con $-OR^h$, fenilo, pirazolilo, pirimidinilo o piridinilo, y en donde dichos fenilo, pirazolilo, pirimidinilo y piridinilo de los sustituyentes opcionales enumerados para alquilo(C_1-C_4) en R^5 se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de R^g .
10. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 9, en donde cada R^f es independientemente hidrógeno, alquilo(C_1-C_4), fenilo, pirazolilo, piridinilo, tetrahidropiranilo, piperidinilo, en donde dichos fenilo, pirazolilo, piridinilo, tetrahidropiranilo y piperidinilo se sustituyen cada uno opcional e independientemente con alquilo(C_1-C_4).
11. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 10, en donde cada R^g es independientemente alquilo(C_1-C_4), alcoxi(C_1-C_4) o halo.
12. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 11, en donde R^b es alquilo(C_1-C_4), fenilo, heteroarilo de 5 a 6 miembros o heterociclilo de 4 a 7 miembros, en donde dichos fenilo y heteroarilo de 5 a 6 miembros para R^b se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo y alcoxi(C_1-C_4), en donde dicho heterociclilo de 4 a 7 miembros para R^b se sustituye opcionalmente con $=O$, y en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^b se sustituye opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, $-OR^h$ y $-NR^iR^k$.
13. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 12, en donde cada R^k es independientemente hidrógeno o alquilo(C_1-C_4).
14. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 13, en donde R^b es alquilo(C_1-C_4), fenilo, piridinilo, pirazolilo, pirimidinilo o piperidinilo, en donde dichos fenilo, piridinilo, pirazolilo y pirimidinilo para R^b se sustituyen cada uno opcional e independientemente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de halo y alcoxi(C_1-C_4), en donde dicho alquilo(C_1-C_4) para R^b se sustituye

opcionalmente con 1 o 2 grupos que se seleccionan de fenilo, OH y NMe₂, y en donde dicho piperidinilo para R^b se sustituye opcionalmente con =O.

15. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 14, en donde R³ es hidrógeno.

16. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 15, en donde X es un alquileo(C₁-
5 C₄) no sustituido.

17. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 16, en donde R⁴ es fenilo o -NHC(O)OR^a.

18. El compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 15, en donde X es un enlace o CH₂.

10 19. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 18 o una sal farmacéuticamente aceptable de este y un portador farmacéuticamente aceptable.

20. Un método para tratar una enfermedad que responde a la inhibición de TREX1 en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un
15 compuesto de cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 18, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o la composición de la Reivindicación 17.

21. El método de la Reivindicación 20, en donde la enfermedad es cáncer.

20

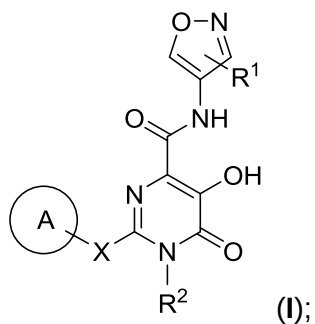
25

30

35

75
RESUMEN

Se proporcionan compuestos de la Fórmula (I):



10 y sales farmacéuticamente aceptables y composiciones de estos que son útiles para tratar una variedad de afecciones asociadas con TREX1.

15

20

25

30

35