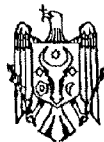




MD/EP 3555105 T2 2021.01.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3555105 (13) T2

(51) Int. Cl: C07D 498/04 (2006.01.01)
A61P 35/00 (2006.01.01)
A61K 31/5365 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

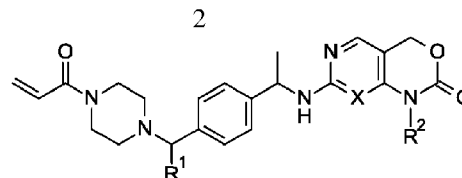
(21) Numărul de depozit: e 2019 1188 (22) Data de depozit: 2017.12.08 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17822882.1, 2017.12.08 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3555105, 2019.10.23 (31) Numărul cererii prioritare: 201662435283 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.12.16 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 01/2021, 2021.01.31 (80) Data publicării menționării acordării de către OEB: EPB nr. 44/2020, 2020.10.28 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 12/2019, 2019.12.31
(71) Solicitanți: ELI LILLY AND COMPANY, US (72) Inventatori: BAUER Renato Alejandro, US; BOULET Serge Louis, US; BURKHOLDER Timothy Paul, US; GILMOUR Raymond, US; HAHN Patric James, US; RANKOVIC Zoran, US (73) Titulari: ELI LILLY AND COMPANY, US (74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compuși de 7-feniletilamino-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă ca calitate de inhibitori ai mutanților IDH1 și IDH2

(57) Rezumat:

1

Un compus, cum este definit aici, sau o compoziție farmaceutică conținând compusul, pentru utilizare în tratarea cancerului mutant IDH1 sau IDH2 având structura:



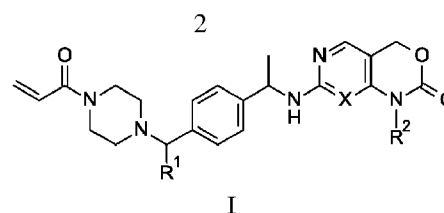
Revendicări: 7

MD/EP 3555105 T2 2021.01.31

(54) 7-phenylethylamino-4h-pyrimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-one compounds as mutant idh1 and idh2 inhibitors

(57) Abstract:

1
A compound, as defined herein, or pharmaceutical composition containing the compound, for use in treating IDH1 or IDH2 mutant cancer and having the structure:



Claims: 7

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

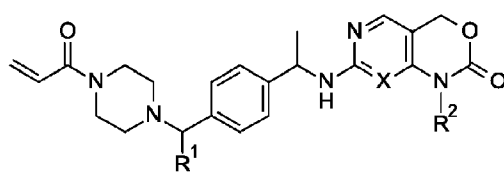
Proteina izocitrat dehidrogenază (IDH) este o enzimă importantă în ciclul acidului citric (acid tricarboxilic sau Krebs). Ciclul acidului citric este centralizat important la multe căi biochimice și este una dintre componentele stabilite cel mai timpuriu ale metabolismului celular.

Izocitratul dehidrogenază catalizează decarboxilarea oxidativă a izocitratului la α -ketoglutarat (2-oxoglutarat). Aceste enzime aparțin la două subclase distincte, din care una utilizează dinucleotide nicotinamidă adenine (NAD(+)) ca acceptor de electron și cealaltă fosfat de dinucleotide nicotinamidă adenine (NADP(+)). Au fost raportate trei izocitrat dehidrogenaze de mamifer: un izocitrat dehidrogenază dependent de NAD(+), o enzimă multisubunitară care se localizează la matricea mitocondrială, și doi izocitrați dehidrogenază dependenți de NADP(+), din care unul este mitocondrial și celălalt predominant citosolic. Fiecare izozimă dependentă de NADP(+) este un dimer. Proteina codificată de gena IDH1 este izocitratul dehidrogenază dependent de NADP(+) găsit în citoplasmă și peroxizomi. Enzima citoplasmatică servește un rol semnificativ în producția de NADPH citoplasmatică. IDH1 este exprimată într-un larg interval de specii și în organisme cărora le lipsește un ciclu complet de acid citric.

Recent, mutații în IDH1, și izoformele asociate IDH2, au fost găsite în câteva tipuri de cancer. S-a descoperit că mutațiile apar la aminoacizi specifici de-a lungul secvenței de proteină și sunt exprimate heterozigot, consistent cu un câștig de funcționare. Aceste mutații apar la reziduurile conservate funcțional și studii biochimice ale formelor mutante de IDH1 și IDH2 au demonstrat o pierdere a funcționării normale, conversia reversibilă a izocitratului la α -ketoglutarat. Rezultatul acestor mutații este de a permite o nouă (sau neomorfică) conversie a α -ketoglutaratului (α KG) la 2-hidroxioglutarat (2HG). Ca rezultat, celulele canceroase care găzduiesc forme mutante de IDH1 sau IDH2 formează concentrații substanțial mai ridicate de 2HG. Nivelurile ridicate de 2HG conduc la un bloc în diferențierea celulară care poate fi inversat prin inhibarea mutanților IDH1 sau IDH2.

Cererea de brevet PCT/US2016/043264 divulgă inhibitori covalenți ai IDH1 mutant. Cererea de brevet PCT/IB2012/055133 divulgă de asemenea inhibitori de proteine IDH mutante. Există o necesitate suplimentară pentru compuși care inhibă selectiv enzimele IDH1 și IDH2 mutante pentru tratamentul diferitelor cancere. Există o necesitate suplimentară pentru compuși care inhibă selectiv enzimele IDH1 și IDH2 mutante demonstrând activitate neomorfică asupra IDH1 și IDH2 de tip sălbatic pentru tratamentul diferitelor cancere. Prezenta invenție furnizează compuși cu Formula I sau Ia care sunt inhibitori de IDH1 și IDH2 mutanți. Compușii cu Formula I sau Ia sunt inhibitori covalenți care inhibă selectiv IDH1 și IDH2 mutanți.

Un aspect din prezenta divulgare este de a furniza compuși inhibitori ai enzimei IDH1 și IDH2 mutante cu formula:



I

in care:

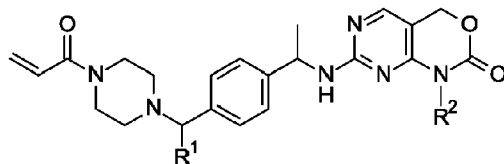
R¹ este -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃, sau -CH₂-ciclopropil;

R² este -CH₃ sau -CH₂CH₃;

X este N sau CH; sau

o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Un aspect al invenției este de a furniza compuși inhibitori ai enzimei IDH1 și IDH2 mutante cu formula:



Ia

in care

5 R¹ este -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃, sau -CH₂-ciclopropil;

R² este -CH₃ sau -CH₂CH₃; sau

o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Un alt aspect din prezenta invenție furnizează un compus cu formula Ia care este:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă;

10 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă;

1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1;

15 1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2;

sau o sare acceptabilă farmaceutic oricăror dintre aceștia.

Un alt aspect din prezenta invenție este un compus cu Formula Ia care este 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-

20 d][1,3]oxazin-2-onă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Un alt aspect din prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică cuprinzând un compus inhibitor al IDH1 mutant cu Formula Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, și un purtător acceptabil farmaceutic.

Un alt aspect din prezenta divulgare furnizează o metodă de tratare a unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este gliom, glioblastom, glioblastom multiform, astrocitom, oligodendrogliom, paragangliom, fibrosarcom, limfom al celulei T angioimunoblastic (AITL), sindrom mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), cancer la tiroidă, cancer colorectal, leucemie mieloidă acută (AML), melanom, cancer la prostată, condrosarcom sau colangiocarcinom la un pacient, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Un alt aspect din prezenta divulgare furnizează o metodă de tratare a unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este fibrosarcom, leucemie mieloidă acută, gliom, sau glioblastom la un pacient, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unei cantități eficiente terapeutic dintr-un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Un alt aspect din prezenta invenție furnizează un compus cu Formula Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în terapie.

Un alt aspect din prezenta invenție furnizează un compus cu Formula Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este gliom, glioblastom, glioblastom multiform, astrocitom, oligodendrogliom, paragangliom, fibrosarcom, limfom al celulei T angioimunoblastic (AITL), sindrom mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), cancer la tiroidă, cancer colorectal, leucemie mieloidă acută (AML), melanom, cancer la prostată, condrosarcom sau colangiocarcinom.

Un alt aspect din prezenta invenție furnizează un compus cu Formula Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este fibrosarcom, leucemie mieloidă acută, gliom, sau glioblastom.

Un alt aspect din prezenta divulgare furnizează utilizarea unui compus cu Formula I sau Ia, sau a unei săruri acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este gliom, glioblastom, glioblastom multiform, astrocitom, oligodendrogliom, paragangliom, fibrosarcom, limfom al celulei T angioimunoblastic (AITL), sindrom mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), cancer la tiroidă, cancer colorectal, leucemie mieloidă acută (AML), melanom, cancer la prostată, condrosarcom sau colangiocarcinom.

Un alt aspect din prezenta divulgare furnizează utilizarea unui compus cu Formula I sau la, sau a unei săruri acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este fibrosarcom, leucemie mieloidă acută, gliom, sau glioblastom.

Termenul „pacient” înseamnă mamifer și „mamifer” include, dar nu este limitat la, un om.

„Cantitate eficientă terapeutică” înseamnă dozajul compusului cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, sau o compoziție farmaceutică conținând compusul, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, necesare pentru a inhiba IDH1 mutant sau IDH2 mutant la un pacient cu cancer, conducând la eliberarea blocării în diferențiere cu inhibarea rezultantă a creșterii celulei tumorale și eliminarea sau încetinirea sau oprirea progresului cancerului la un pacient. Dozajele anticipate dintr-un compus cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia sunt în intervalul de la 1 mg/pacient/zi până la 2000 mg/pacient/zi. Dozajele preferate sunt anticipate a fi în intervalul de la 5 mg/pacient/zi până la 1800 mg/pacient/zi. Cele mai preferate doze sunt anticipate a fi în intervalul de la 40 mg/pacient/zi până la 1600 mg/pacient/zi. Dozajul exact necesar pentru a trata un pacient și lungimea timpului de tratament vor fi determinate de către un medic având în vedere stadiul și severitatea bolii precum și nevoile specifice și răspunsul pacientului individual. Deși exprimate ca dozaj pe o bază zilnică, dozarea administrării poate fi ajustată pentru a furniza un beneficiu terapeutic mai optim la un pacient și pentru a gestiona sau ameliora orice toxicitate asociată cu medicamentul. În plus față de doza zilnică, poate fi adecvată dozarea de două ori pe zi (B.I.D.); dozarea de trei ori pe zi (T.I.D.); dozarea în fiecare altă zi (Q2D); fiecare altă zi pe o perioadă de cinci zile urmată de două zile fără dozare (T.I.W.); sau la fiecare a treia zi (Q3D).

Termenii „tratament”, „tratează”, și „tratarea”, sunt destinați să includă întregul spectru al intervenției pentru cancerul de care suferă pacientul, cum ar fi administrarea compusului activ pentru a atenua, încetini, sau inversa unul sau mai multe simptome și pentru a întârzia progresul cancerului chiar dacă cancerul nu este de fapt eliminat.

Termenul $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ înseamnă 2-metilpropil, termenul $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ înseamnă 2-metoxietil, și termenul $-\text{CH}_2$ -ciclopropil înseamnă ciclopropilmetil.

Un compus cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este preferabil formulat ca compoziție farmaceutică utilizând un purtător acceptabil farmaceutic și administrat pe o varietate de căi. Preferabil, astfel de compoziții sunt pentru administrare orală. Astfel de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. *Vezi, de exemplu*, REMINGTON: THE SCIENCE ȘI PRACTICE OF PHARMACY, L.V. Allen, Editor, ediția a 22-a, Pharmaceutical Press, 2012.

Intr-o realizare particulară, compoziția farmaceutică cuprinde 7-[[[(1S)-1-{4-[(1S)-1-(4-acriloilpiperazin-1-il)-2-ciclopropiletil]fenil}etil]amino}-1-etil-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, împreună cu un purtător acceptabil farmaceutic și opțional alte ingrediente terapeutice în special pentru tratamentul cancerului în general sau a unui tip specific de cancer.

Un compus cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic, poate fi administrat fie simultan cu, sau înainte, sau după, unul sau mai mulți alți agenți terapeutici. Compusul cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic, când se administrează cu unul sau mai mulți alți agenți terapeutici, poate fi administrat separat, pe aceeași sau pe căi diferite de administrare, sau împreună în aceeași compoziție farmaceutică ca celălalt agent terapeutic. Unde sunt administrați unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari, administrarea fiecărui agent terapeutic poate fi simultană, separată, sau secvențială.

Un compus cu Formula I sau la este capabil să reacționeze cu un număr de acizi anorganici și organici pentru a forma sarea de adiție a unui acid acceptabilă farmaceutic. Astfel de săruri acceptabile farmaceutic și metodologia comună pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. *Vezi, de exemplu*, P. Stahl, și colab., HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, și colab., „Pharmaceutical Salts, „Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, nr. 1, ianuarie 1977.

Un compus cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, poate fi preparat printr-o varietate de proceduri cunoscute în domeniu, precum și prin cele descrise mai jos. Etapele de sinteză specifice pot fi combinate într-o ordine diferită pentru a prepara un compus cu Formula I sau la, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Suplimentar, anumiți intermediari descriși în următoarele preparări pot conține unul sau mai multe grupări de protecție la azot. Se înțelege că grupările de protecție pot fi variate cum este apreciat de către o persoană calificată în domeniu depinzând de condițiile de reacție particulare și transformările particulare, care sunt efectuate. Condițiile de protecție și deprotejare sunt bine

cunoscute specialistului calificat și sunt descrise în literatură (vezi de exemplu „Greene's Protective Groups in Organic Synthesis“, a cincea ediție, de Peter G.M. Wuts și Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc. 2014).

5 Compușii cu Formula I sau Ia sunt denumiți în conformitate cu IUPAC, și pot fi de asemenea denumiți în conformitate cu CAS, și pot fi utilizate și alte nume pentru a identifica neambiguu un compus cu Formula I sau Ia, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Se va înțelege că un compus cu Formula I sau Ia poate fi reprezentat ca stereoizomer singur. Există doi centri chirali dând naștere la patru diastereomeri. Așa cum s-a utilizat în acest document, referirile la un singur stereoizomer se înțelege că includ de asemenea amestecuri 10 stereoizomerice incluzând compușii denumiți sau reprezentați cu Formula I sau Ia. Aici, desemnările Cahn-Ingold-Prelog ale (R) și (S) pot fi utilizate pentru a se referi la stereoizomerii specifici. Stereoizomerii specifici pot fi preparați prin sinteză stereospecifică utilizând materii prime enantiomeric pure sau îmbogățite. Stereoizomerii specifici ai materiilor prime, intermediarilor, sau amestecurilor racemice incluzând compușii cu Formula I sau Ia pot fi rezolvați 15 prin tehnici bine cunoscute în domeniu, cum ar fi cele găsite în Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel și S. H. Wilen (Wiley 1994) și Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet, și S. H. Wilen (Wiley 1991), incluzând cromatografia cu fază chirală staționară, separări enzimatică, sau cristalizare fracțională sau cromatografie de diastereomeri formați în acel scop, cum ar fi sărurile diastereomerice. Pentru compușii cu Formula I sau Ia având o configurație cu toți stereocentrii prezenți, „substanțial enantiomeric pur“ înseamnă că puritatea izomerică este mai mare de 90% exces enantiomeric. Într-o altă realizare, o puritate izomerică a unui compus cu Formula I sau Ia este mai mare de 95% exces enantiomeric. În încă o altă realizare puritatea izomerică a unui compus cu Formula I sau Ia este mai mare de 98% exces enantiomeric. 20 În încă o altă realizare puritatea izomerică a unui compus cu Formula I sau Ia este mai mare de 99% exces enantiomeric. Toți stereoizomerii, individuali și incluzând amestecurile diastereomerice ale compușilor cu Formula I sau Ia sunt avuți în vedere în domeniul prezentei invenții. Desemnările „izomer 1“ și „izomer 2“ și „diastereomer 1“ și „diastereomer 2“ se referă la compușii care eluează din cromatografia chirală primul și respectiv al doilea, și dacă cromatografia chirală este inițiată devreme în sinteză, aceeași desemnare este aplicată intermediarilor și 30 exemplurilor ulterioare.

Compușii utilizați ca materii prime inițiale în sinteza compușilor cu Formula I sau Ia sunt bine cunoscuți și, în măsura în care nu sunt disponibili comercial, pot fi cu ușurință sintetizați utilizând referirile specifice furnizate, prin proceduri standard utilizate în mod obișnuit de cei având calificare obișnuită în domeniu sau care sunt găsite în texte de referință generale.

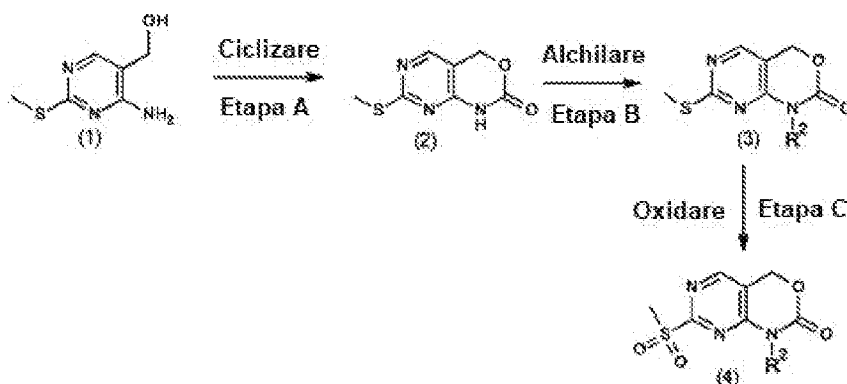
35 Exemple de proceduri cunoscute și metode le includ pe cele descrise în texte de referință generale cum ar fi Comprehensive Organic Transformări, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Sintetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5th Edition, Michael B. Smith and Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4th Edition, Part B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey and Richard J. Sundberg, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2000, etc., și referiri citate în acestea.

Anumite abrevieri sunt definite după cum urmează: „ACN“ înseamnă acetonitril; „αKG“ înseamnă alfa-ketoglutarat sau 2-ketoglutarat; „aloc“ înseamnă aliloxycarbonil; „ATCC“ înseamnă Colecția de Culturi de Tip American; „BCA“ înseamnă acid biconinonic; „BSA“ înseamnă albumină din ser bovin; „CDI“ înseamnă 1,1'-carbonildiimidazol; „DCC“ înseamnă 1,3-diciclohexilcarbodiimidă; „DCM“ înseamnă diclorometan; „DEAD“ înseamnă dietil azodicarboxilat; „DIAD“ înseamnă azodicarboxilat de diizopropil; „DIC“ înseamnă diizopropilcarbodiimidă; „DIPEA“ înseamnă diizopropiletilamină sau N-etil-N-izopropil-propan-2-amină; „DMAP“ înseamnă dimetilaminopiridină; „DMF“ înseamnă dimetilformamidă; 50 „DMSO“ înseamnă dimetil sulfoxid; „DTT“ înseamnă ditiotreititol; „EDC“ înseamnă EDAC, EDCI, sau clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimidă; „EDTA“ înseamnă acid etilendiaminotetraacetic; „EGTA“ înseamnă acid etilen glicol tetraacetic; „EtOAc“ înseamnă acetat de etil; „EtOH“ înseamnă etanol sau alcool etilic; „Ex“ înseamnă exemplu; „HATU“ înseamnă hexafluorofosfat de (dimetilamino)-N,N-dimetil(3*H*-[1,2,3]triazolo[4,5-*b*]piridin-3-iloil)metaniminiu; „HBTU“ înseamnă hexafluorofosfat de 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluroniu; „2HG“ înseamnă 2-hidroglutarat; „d₅-3HG“ înseamnă acid 3-hidroxi-1,5-pentandioic-2,2,3,4,4-d₅; „HILIC“ înseamnă cromatografie lichidă cu interacțiune hidrofilă; „HOAt“ înseamnă 1-hidroxi-7-azobenzotriazol; „HOBt“ înseamnă 1-hidroxi-7-azobenzotriazol hidrat; „HPLC“ înseamnă cromatografie lichidă de înaltă performanță; „IC₅₀“ înseamnă concentrația unui 60 agent care produce 50% din răspunsul inhibitor maxim posibil pentru acel agent; „mCPBA“ înseamnă acid *meta*-cloroperbenzoic; „MeOH“ înseamnă metanol sau metil alcool; „NADP⁺“ și

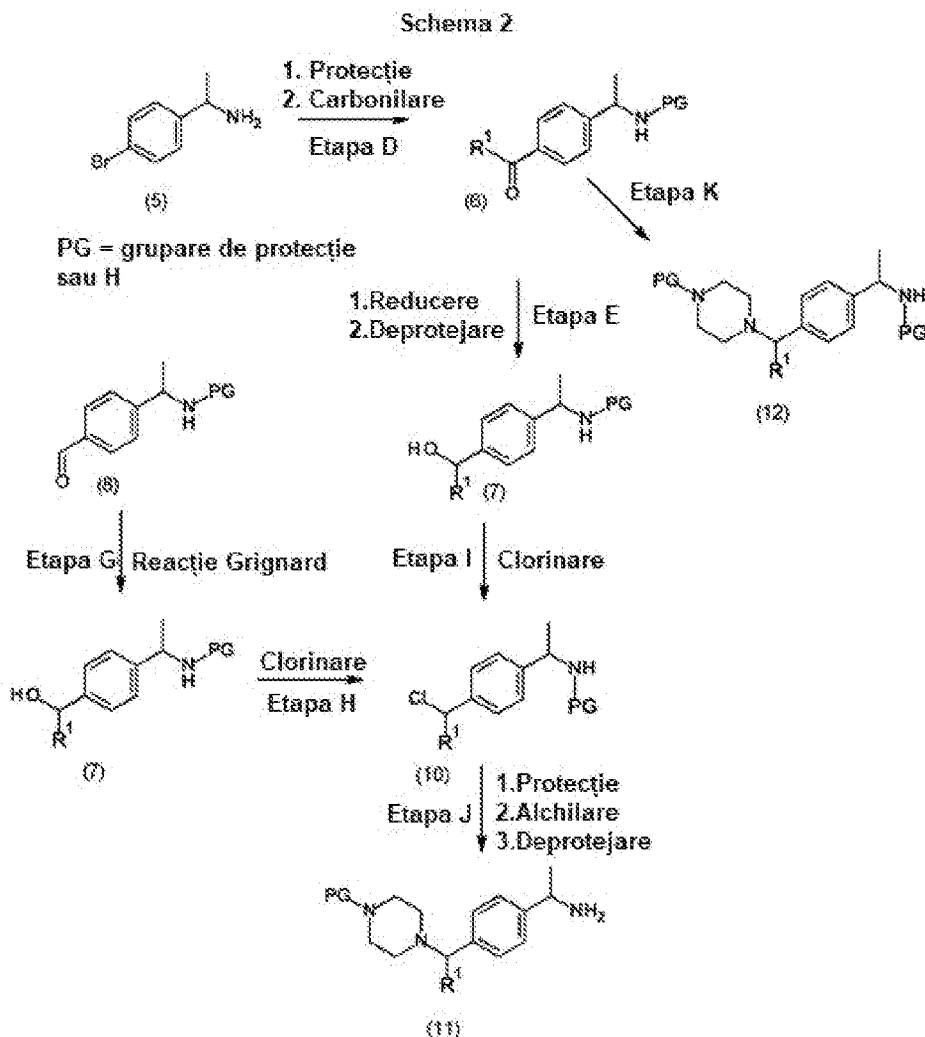
NADPH“ înseamnă formele oxidată și redusă de fosfat de dinucleotide nicotinamidă adenine respectiv; „NMP“ înseamnă N-metil-2-pirolidonă; „PG“ înseamnă grupare de protecție; „Prep“ înseamnă preparare; „PyBOP“ înseamnă hexafluorofosfat de benzotriazol-1-iloxitripirolidino-fosfonium; „PyBrop“ înseamnă fosfat de bromo-tris-pirolidino fosfoniuhexafluoro; „rpm“ înseamnă rotații pe minut; „(R)-RUCY®-XylBINAP“ înseamnă RuCl[(R)-daipena][(R)-xilbinap; „S_NAr“ înseamnă substituție aromatică nucleofilică; „TEA“ înseamnă trietilamină; „TFA“ înseamnă acid trifluoroacetic; „THF“ înseamnă tetrahidrofuran; și „Tris“ înseamnă tris(hidroximetil)aminometan.

Compuși cu Formula I sau Ia, sau sărurile acceptabile farmaceutic ale acestora, pot fi preparate printr-o varietate de proceduri cunoscute în domeniu, din care unele sunt ilustrate în schemele, preparările, și exemplele de mai jos. Etapele de sinteză specifice pentru fiecare din căile descrise pot fi combinate în diferite moduri, sau în conjuncție cu etape din diferite scheme, pentru a prepara compuși cu Formula I sau Ia, sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora. Produsele fiecărei etape din schemele de mai jos pot fi recuperate prin metode convenționale bine cunoscute în domeniu, incluzând extragerea, evaporarea, precipitarea, cromatografierea, filtrarea, triturarea, și cristalizarea. În schemele de mai jos, toți substituenții dacă nu se indică altfel, sunt cum s-au definit anterior. Reactivii și materiile prime sunt cu ușurință disponibile cuiva având calificare obișnuită în domeniu.

Schema 1



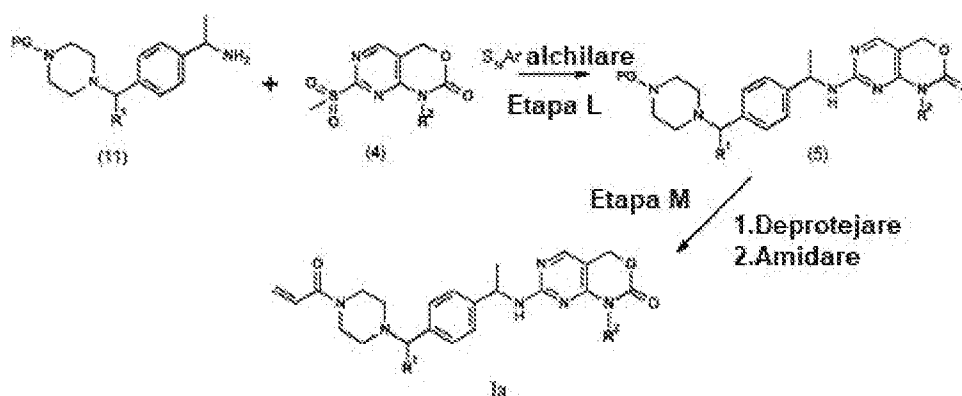
În Schema 1, o serie a reacțiilor conduce la un 1-substituit-7-(metilsulfonil)-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, (4), produsul din Etapa C unde R² este cum s-a definit anterior. „PG“ este o grupare de protecție dezvoltată pentru gruparea amino sau gruparea oxigen cum ar fi pentru carbamați, amide sau esteri. De exemplu, 5-hidroxi metil 4-amino-2-metilsulfanil-pirimidină poate fi ciclizată sub condiții standard de carbamoilare la oxazină-2-onă utilizând trifosgen și o bază organică cum ar fi DIPEA sau TEA la o temperatură de la aproximativ -30 până la -35°C pentru a da Compusul (2), produsul din Etapa A. Alternativ, o dihalogenură carbonil sau o di-pseudohalogenură carbonil cum ar fi CDI, fosgen, sau difosgen poate fi utilizată în loc de trifosgen pentru a completa carbamoilarea. Amina oxazinei poate fi alchilată cu halogenura alchil substituită adecvat cum ar fi un reactiv iodo într-un solvent cum ar fi NMP și o bază anorganică cum ar fi K₂CO₃ la o temperatură de aproximativ 50-65°C pentru a da Compusul (3), produsul din Etapa B. Alternativ, o reacție Mitsunobu poate fi realizată pentru a alchila amina oxazinei utilizând un alcool adecvat cum ar fi MeOH. Reacțiile Mitsunobu sunt bine cunoscute în domeniu și pot converti o grupare hidroxil într-o grupare îndepărtabilă care este afișată de o largă varietate de nucleofile cum ar fi un carbamat utilizând trifenilfosfină și un azodicarboxilat cum ar fi DIAD sau DEAD într-un solvent cum ar fi THF pentru a da Compusul (3). Sulfida poate fi oxidată la sulfonă în condiții bine cunoscute în domeniu cum ar fi mCPBA sau peroximonosulfat de potasiu la o temperatură de aproximativ 10 până la 25°C într-un solvent cum ar fi ACN sau DCM pentru a da Compusul (4), produsul din Etapa C.



- În Schema 2, un (4-(1-aminoetil)fenil)metanol (7) poate fi generat în câteva etape dintr-o aril halogenură cum ar fi o bromură (5) utilizând proceduri bine cunoscute specialistului calificat.
- 5 Amina poate fi protejată în sub-etapa 1, Etapa D, unde „PG” este o grupare de protecție dezvoltată pentru gruparea amino cum ar fi o amidă. Aril bromura protejată (5) poate fi convertită la o cetonă sub condiții de carbonilare cu litiu pentru a da aril cetona (6) în sub-etapa 2, Etapa D. Cetona poate fi apoi redusă utilizând un agent reducător cum ar fi borohidrua de sodiu într-un solvent cum ar fi MeOH în sub-etapa 1, Etapa E. Amina poate fi deprotejată în această etapă (sub-etapa 2, Etapa E) sau la un moment mai târziu în sinteză pentru a da Compusul (7). Alternativ, Compusul (6) poate fi convertit direct la Compusul (12) într-o aminare reductivă utilizând izopropoxid de titan(IV) într-un solvent cum ar fi THF și cu încălzire la aproximativ 60°C urmată de răcire și adăugare de MeOH și un agent reducător cum ar fi cianoborohidrua de sodiu pentru a da Compusul (12). Compusul (7) poate fi convertit la o benzil halogenură cum ar fi o clorură sub condiții standard de halogenare utilizând un agent de halogenare cum ar fi clorura de tionil sau POCl₃ într-un solvent cum ar fi DCM pentru a da compusul (10), Etapa I. Compusul (10) poate fi protejat dacă este necesar și alchilat în Etapa J. De exemplu, amina (10) poate fi protejată în sub-etapa 1 a Etapei J utilizând o grupare de protecție cum ar fi un trifluoroacetil sau CBZ. Astfel de grupări de protecție sunt bine cunoscute și apreciate în domeniu. Alternativ, Compusul 10 poate fi preparat dintr-o aldehydă, Compusul (8). Compusul (8) poate fi preparat prin oxidarea alcoolului benzilic corespunzător sub astfel de condiții ca periodinanul Dess-Martin într-un solvent cum ar fi DCM pentru a da o aldehydă (8). O reacție Grignard poate fi realizată în Etapa G pe aldehydă pentru a da Compusul (7). Compusul (7) din etapa G poate fi clorinat în Etapa H pentru a da Compusul (10) cum s-a discutat mai sus pentru Etapa I. Clorura compusului (10) poate fi afișată cu o piperazină mono-protejată în a doua etapă, procedură cu un singur recipient. Nu este întotdeauna necesară protecția 1-feniletilaminei dar dacă se alege protecția, este avantajoasă utilizarea a diferite grupări de protecție pe 1-feniletilamină decât pe produsul piperazină amină (11), Etapa J,
- 10
- 15
- 20
- 25

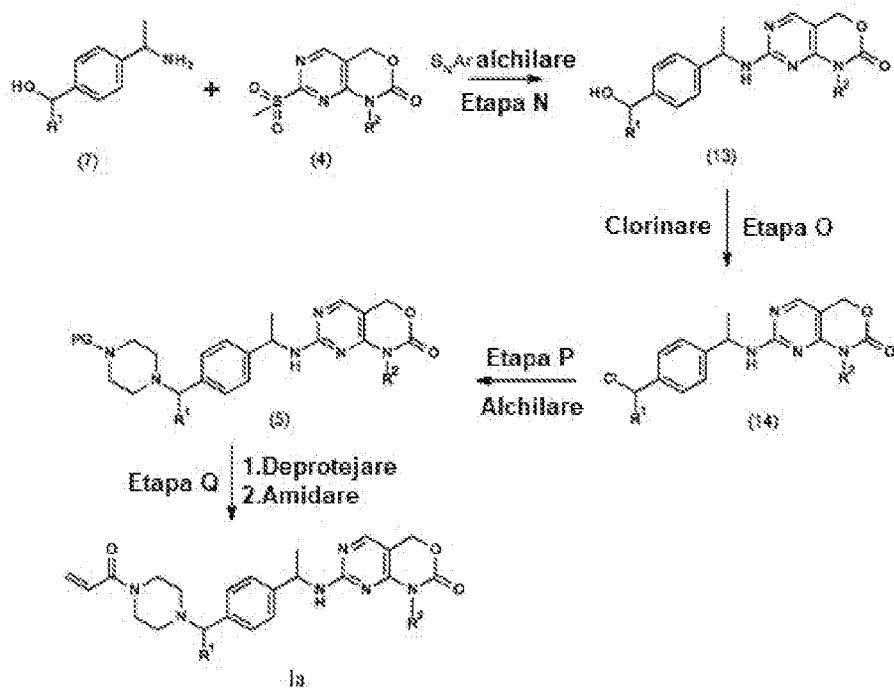
sub-etapa 1, pentru a deproteja selectiv unul sau cealaltă PG în etapa dorită. De exemplu, 1-feniletilamina poate fi reacționată cu anhidridă trifluoroacetică utilizând o bază organică cum ar fi TEA într-un solvent cum ar fi DCM la o temperatură de aproximativ 0-5°C pentru a da produsul amină protejat din sub-etapa 1, Etapa J. O persoană calificată în domeniu ar înțelege că pot fi
 5 utilizate și alte grupări de protecție pe amină, cum ar fi CBZ. Deplasarea clorurii poate fi apoi realizată în condiții bine cunoscute de către o persoană calificată în domeniu. De exemplu, halogenura poate fi deplasată de piperazina protejată sau neprotejată utilizând o bază anorganică cum ar fi K₂CO₃ și se utilizează KI, sau NaI ca și catalizator nucleofilic pentru a accelera reacția. Amestecul poate fi încălzit la aproximativ 60-80°C într-un solvent cum ar fi ACN pentru a da
 10 compusul protejat (11) din sub-etapa 2, Etapa J. Gruparea de protecție pe 1-feniletilamină poate fi îndepărtată cu o bază cum ar fi hidroxid de potasiu apos pentru a da Compusul (11) din sub-etapa 3, Etapa J.

Schema 3



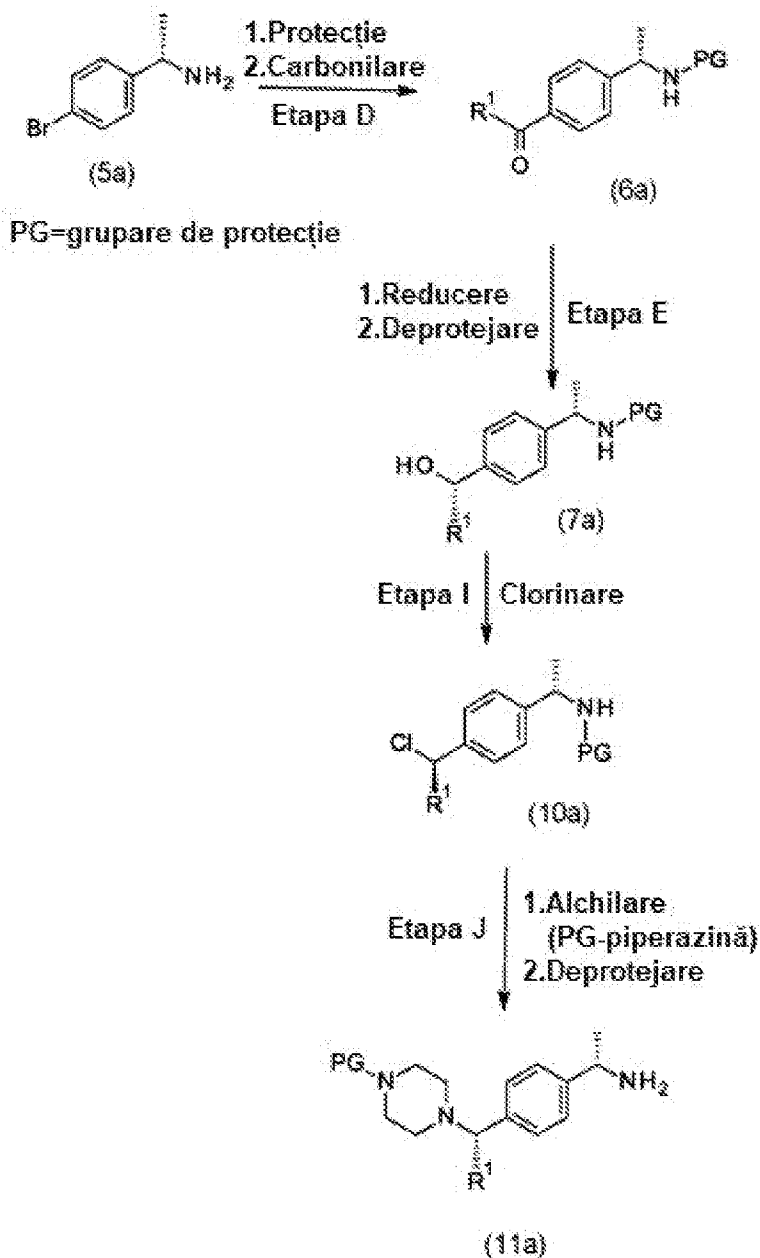
În Schema 3, Compusul (11) poate fi reacționat cu Compusul (4), Schema 1, într-o reacție
 15 S_NAr utilizând o bază organică cum ar fi DIPEA, CsF pentru a accelera reacția, un solvent cum ar fi DMSO, și o temperatură de aproximativ 70-80°C pentru a da produsul din Etapa L. În Etapa M, sub-etapa 1, o *terț*-butoxi piperazină protejată poate fi deprotejată utilizând un acid cum ar fi HCl în dioxan și MeOH sau TFA în DCM în timp ce o aloc piperazină protejată poate fi deprotejată în
 20 prezența unei surse de paladiu cum ar fi tetrakis(trifenilfosfin)paladiu(0) catalitic într-un solvent cum ar fi THF utilizând o nucleofilă moale cum ar fi dimedona pentru a da piperazina deprotejată din sub-etapa 1, Etapa M. În sub-etapa 2, Etapa M, piperazina poate fi amidată cu clorură de acrilil la o temperatură de la aproximativ -50 până la -78°C cu sau fără o bază organică cum ar fi TEA dacă amina este o sare acidă într-un solvent cum ar fi DCM pentru a da compuși cu Formula
 25 Ia. Alternativ, o cuplare amidă poate fi realizată cu acid acrilic și amina adecvată într-un solvent cum ar fi DMF cu un reactiv de cuplare cum ar fi EDC și un aditiv cum ar fi HOBt. O persoană calificată în domeniu va recunoaște că există un număr de metode și reactivi pentru formarea amidei care rezultă din reacția de acizi carboxilici și amine. De exemplu, reacția aminei adecvate și acidului acrilic în prezența unui reactiv de cuplare cu sau fără o bază organică cum ar fi DIPEA sau TEA poate furniza un compus cu Formula Ia. Alți reactivi de cuplare includ carbodiimide, cum
 30 ar fi DCC, DIC, sau un carbonildiimidazol cum ar fi CDI. Alți aditivi de cuplare amidici, cum ar fi HO At pot fi de asemenea utilizați pentru a spori reacția. Suplimentar, ar putea fi utilizate săruri de uraniu sau fosfoniu de anioni non-nucleofilici, cum ar fi HBTU, HATU, PyBOP, și PyBrOP în loc de reactivii de cuplare mai tradiționali. Un aditiv cum ar fi DMAP poate fi utilizat pentru a
 35 accelera reacția de amidare dorită.

Schema 4



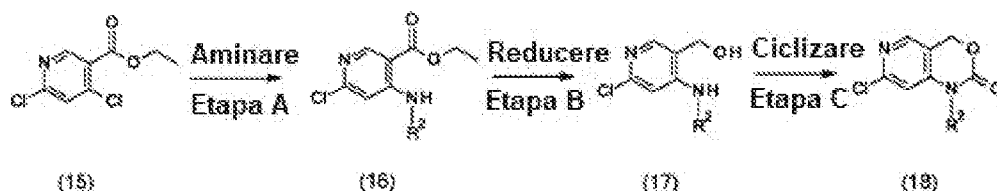
- Alternativ in Schema 4, amina produsului deprotejat al compusului (7), Schema 2 poate fi reacționată cu Compusul (4) cum s-a descris in Schema 3, Etapa L într-o alchilare S_NAr pentru a da Compusul 13. Hidroxilul poate fi clorinat cum s-a descris in Etapa I, Schema 2 pentru a da Compusul 14, Etapa O. Clorura compusului (14) poate fi afișată într-o alchilare cu piperazină cum s-a descris in Schema 2, Etapa 11, sub-etapa 2 pentru a da Compusul (5). Piperazina protejată poate fi deprotejată și piperazina apoi amidată cum s-a descris in Schema 3, Etapa M pentru a da compuși cu Formula Ia.

Schema 5



- In schema 5, un (4-(1-aminoetil)fenil)metanol chiral (7a) poate fi generat in cateva etape dintr-o halogenură chiral aril cum ar fi o bromură (5a) utilizând proceduri bine cunoscute specialistului calificat. Amina poate fi protejată în sub-etapa 1, Etapa D, unde „PG” este o grupare de protecție dezvoltată pentru gruparea amino cum ar fi o amidă. Bromura aril (5a) poate fi convertită la o cetonă sub condiții de carbonilare cu litiu pentru a da aril cetona (6a) in sub-etapa 2, Etapa D. Cetona poate fi apoi redusă asimetric utilizând un agent reducător chiral cum ar fi (*R*)-RUCY-XylBINAP într-un solvent cum ar fi EtOH pentru a furniza compusul 7a in sub-etapa 1, Etapa E. Compusul (7a) poate fi convertit la o halogenură chiral benzil cum ar fi o clorură, sub condiții standard de halogenare utilizând un agent de halogenare cum ar fi clorura de benzoil într-un solvent cum ar fi *t*-butil eter pentru a da compusul (10a), Etapa I. Compusul (10a) este mai întâi reacționat cu o piperazină protejată (PG-piperazină) în prezența unei baze cum ar fi bicarbonatul de sodiu într-un solvent cum ar fi acetonitril pentru a da forma protejată în sub-etapa 1, Etapa J. Forma protejată este apoi deprotejată cu o bază cum ar fi hidroxidul de potasiu apos într-un solvent cum ar fi EtOH pentru a furniza compusul (11a), sub-etapa 2, Etapa J.

Schema 6

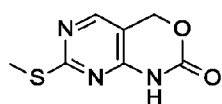


În Schema 6, o serie a reacțiilor conduce la o 1-substituit-7-cloro-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă (18), produsul din Etapa C unde R^2 este cum s-a definit anterior. De exemplu, etil 4,6-dicloropiridin-3-carboxilat (15) poate fi reacționat cu o amină sub condiții standard pentru a da 6-cloro-4-(amino)piridin-3-carboxilat (16) într-un solvent cum ar fi acetonitril. Reducerea grupării ester în Compusul (16) utilizând un reactiv hidrură cum ar fi hidrură de litiu aluminiiu într-un solvent cum ar fi THF dau (4-amino-6-cloro-3-piridil)metanol (17). Compusul cum ar fi 17 poate fi ciclizat sub condiții standard de carbamoidare la oxazină-2-onă utilizând trifosgen și o bază organică cum ar fi DIPEA sau TEA la o temperatură de aproximativ -20°C pentru a da Compusul (18), produsul din Etapa C. Alternativ o dihalogenură carbonil sau o di-pseudohalogenură carbonil cum ar fi CDI, fosgen, sau difosgen poate fi utilizată în loc de trifosgen pentru a completa carbamoidarea. Compusul 11, preparat așa cum se arată mai sus în Schemele 2 sau 5, sau cum s-a descris în alternativele la fiecare Schemă, poate fi reacționat cu Compusul 18 sub condiții standard de alchilare. Compusul intermediar rezultat este apoi deprotejat și amidat cum s-a descris mai sus în Schemele 3 sau 4 pentru a da compușii cu Formula I unde X este CH.

Intr-o etapă opțională, o sare acceptabilă farmaceutic a unui compus cu Formula I sau Ia poate fi formată prin reacția unei baze libere adecvate cu Formula I sau Ia cu un acid acceptabil farmaceutic adecvat într-un solvent adecvat sub condiții standard. Suplimentar, formarea de astfel de săruri poate avea loc simultan după deprotejarea unei grupări de protecție la azot. Formarea de astfel de săruri este bine cunoscută și apreciată în domeniu. Vezi, de exemplu, Gould, P.L., „Salt selection for basic drugs,” International Journal of Pharmaceutics, 33: 201-217 (1986); Bastin, R.J., și colab. „Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities”, Organic Process Research and Development, 4: 427-435 (2000); și Berge, S.M., și colab., „Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19, (1977). Cineva având calificare obișnuită în domeniu va aprecia că un compus cu Formula I sau Ia este cu ușurință convertit la și poate fi izolat ca sare acceptabilă farmaceutic.

Preparare 1

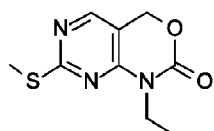
7-metilsulfanil-1,4-dihidropirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă



Se adaugă trifosgen (859 g, 2,9 mol) la o soluție de (4-amino-2-metilsulfanil-pirimidin-5-il)metanol (900 g, 5,26 mol) în THF (22,5 L) peste 15 minute la -30°C . Se adaugă DIPEA (2,449 g, 18,92 mol) într-o oră, în timp ce se menține temperatura reacției între -35°C și -30°C . Amestecul de reacție este apoi turnat peste apă cu gheață (30 L) și se adaugă 2-metiltetrahydrofuran (10 L). Faza organică este spălată cu apă și saramură. Faza organică este uscată pe Na_2SO_4 și este concentrată la sec. Produsul brut este suspendat cu eter de petrol/EtOAc (1:1), filtrat, și concentrat pentru a da un solid galben care este transportat fără purificare suplimentară (890,5 g, 1,62 mol, puritate 83%, randament 86%). MS (m/z): 198 (M+H).

Preparare 2

1-etil-7-(metiltio)-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă

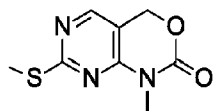


La o soluție de 7-metilsulfanil-1,4-dihidropirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (280 g, 1,42 mol) în NMP (2,24 L) se adaugă K_2CO_3 (294,2 g, 2,13 mol) și iodură de etil (336,3 g, 1,99 mol) la

temperatura camerei. Amestecul este agitat timp de 16 ore la 50°C și apoi diluat cu DCM (3 L) și apă (6 L). Faza organică este separată și spălată cu apă și saramură și concentrată la sec pentru a da compusul brut din titlu (286 g, 1,27 mol, puritate 83%, randament 91%). MS (m/z): 226 (M+H).

Preparare 3

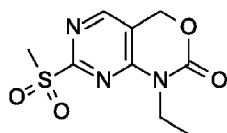
5 1-metil-7-metilsulfanil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă



10 La o soluție de trifenilfosfină (1,61 g, 6,08 mmol) și 7-metilsulfanil-1,4-dihidropirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (1,00 g, 5,07 mmol) în THF (25 mL) se adaugă MeOH (0,248 mL, 6,08 mmol) urmat de adăugarea în picătură de DIAD (1,21 mL, 6,08 mmol) la temperatura ambiantă. După agitare peste noapte, solventul este îndepărtat sub vid și uleiul galben rezultat este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu (40-50% EtOAc/hexani) pentru a da compusul din titlu ca solid alb (1,08 g, 5,11 mmol, cantitativ). MS (m/z): 212 (M+H).

15 Preparare 4

1-etil-7-(metilsulfonil)-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă



20 La o soluție agitată de 1-etil-7-(metiltio)-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (286 g, 1,24 mol) în ACN (2,8 L) și apă (1,4 L) se adaugă peroximonosulfat de potasiu (1526 g, 2,48 mol) ca solid peste 20 minute, și amestecul rezultat este agitat timp de 16 ore la 10-20°C. Amestecul de reacție este filtrat și turta filtrată obținută este spălată cu DCM. Filtratele combinate și DCM sunt spălate cu 5% Na₂SO₃, apă, și saramură. Faza organică este uscată pe Na₂SO₄ și
25 concentrată pentru a furniza compusul din titlu (133,8 g, puritate 93%, randament 41%). MS (m/z): 258 (M+H).

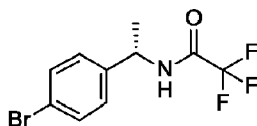
Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda de Preparare 4.

Tabelul 1

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (M+H) (m/z)
5	1-metil-7-metilsulfonil-4H-pirimido[4,5-d] [1,3]oxazin-2-onă		244

30 Preparare 6

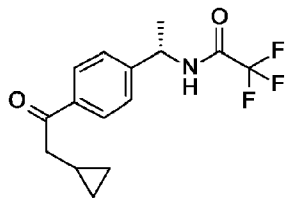
N-[(1S)-1-(4-bromofenil)etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă



35 Se adaugă anhidridă trifluoroacetică (165 mL, 1,17 mol) în picătură la o soluție de (1S)-1-(4-bromofenil)etanamină (213 g, 1,06 mol) în ACN (1,3 L) la 5°C urmată de adăugarea în picătură de TEA (326 mL, 2,34 mol) într-o oră. După 30 minute, se adaugă apă (3 L) și saramură (1 L) conducând la formarea a unui precipitat incolor. Suspensia este agitată timp de 15 minute și apoi solidul este filtrat, spălat cu apă și hexani, și uscat prin curent de aer urmat de uscare la 40°C sub
40 vid pentru a da compusul din titlu (290 g, 92%). ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1,44 (d, 3H, J = 7,1 Hz), 4,98 (dddd, 1H, J = 7,6, 7,1, 7,1, 7,1 Hz), 7,30 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,55 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 9,91 (d, 1H, J = 7,6 Hz).

Preparare 7

45 N-[(1S)-1-[4-(2-ciclopropilacetil)fenil]etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă



- Se adaugă *n*-butil litiu (2,5 M în hexani, 53 mL, 130 mmol) în picătură la o soluție de *N*-[(1*S*)-1-(4-bromofenil)etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă (18,00 g, 60,79 mmol) în THF (600 mL) la -78°C astfel încât să mențină o temperatură internă sub -70°C. După ce adăugarea este completă, amestecul este agitat timp de 45 minute la -78°C și apoi se adaugă 2-ciclopropil-*N*-metoxi-*N*-metil-acetamidă (11,4 g, 79,6 mmol) ca soluție în THF (10 mL). Amestecul este agitat la -78°C timp de 45 minute, se adaugă clorură de amoniu saturată apoasă, și amestecul este încălzit la temperatura camerei. Straturile sunt separate și stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru, filtrat, și concentrat sub presiune redusă. La solid se adaugă o cantitate mică de DCM și amestecul este încălzit rapid pentru a dizolva solidele. Amestecul este concentrat până înainte de precipitare și apoi se adaugă hexani (150 mL) în picătură cu agitare viguroasă pentru a da un solid incolor. Solidul este colectat prin filtrare, spălat cu o cantitate mică de hexani, și uscat sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (13,82 g, 76%) ca solid incolor. MS (*m/z*): 298,3 (*M*-H).

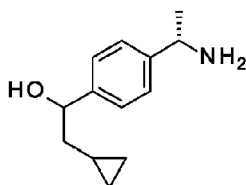
- Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda de Preparare 7.

Tabelul 2

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (<i>m/z</i>) (<i>M</i> +H)
8	2,2,2-trifluoro- <i>N</i> -[(1 <i>S</i>)-1-[4-(3-metoxipropanoil)fenil]etil]acetamidă,		304

Preparare 9**1-[4-[(1*S*)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etanol**

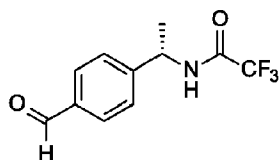
20



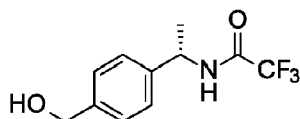
- Se adaugă borohidruură de sodiu (0,1411 g, 3,729 mmol) la o soluție de *N*-[(1*S*)-1-[4-(2-ciclopropilacetil)fenil]etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă (558 mg, 1,86 mmol) în MeOH (15 mL) răcită într-o baie de apă cu gheață. Amestecul este agitat timp de aproximativ 2,5 ore, și apoi se adaugă hidroxid de potasiu (800 mg, 14,2 mmol) în apă (3 mL). Amestecul este agitat la temperatura camerei timp de aproximativ 20 ore. Amestecul este concentrat și partiționat între DCM și apă. Stratul organic este spălat cu clorură de sodiu saturată apoasă, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat, și concentrat pentru a da compusul din titlu (354 mg, 1,38 mmol, 74%) ca solid alb. Materialul este utilizat fără purificare suplimentară. ES/MS (*m/z*): 189,0 (*M*-OH).

Preparare 10**2,2,2-trifluoro-*N*-[(1*S*)-1-(4-formilfenil)etil]acetamidă**

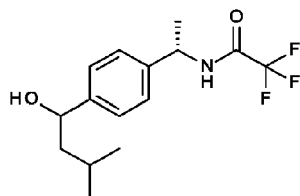
35



Se adaugă periodinan Dess-Martin (20,9 g, 49,3 mmol) la 0°C la o soluție de 2,2,2-trifluoro-N-[(1S)-1-[4-(hidroximetil)fenil]etil]acetamidă (11,1 g, 44,9 mmol) în DCM (450 mL). Amestecul de reacție este agitat peste noapte și lăsat să se încălzească la temperatura camerei. Amestecul de reacție este diluat cu DCM suplimentar și spălat cu NaHCO₃ saturată apoasă, Na₂S₂O₃ saturată apoasă, și saramură. Organicele combinate sunt uscate (Na₂SO₄), filtrate, și concentrate pentru a da un reziduu care este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu eluand cu un gradient de 0-50% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu ca solid alb (9,5 g, 39 mmol, 86%). ES/MS (m/z): 244 (M-H).

Preparare 10a**2,2,2-trifluoro-N-[(1S)-1-[4-(hidroximetil)fenil]etil]acetamidă**

Se adaugă anhidridă trifluoroacetică (12 mL, 85,4 mmol) la 0°C la o soluție de [4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]metanol (10,8 g, 71,4 mmol) în CH₂Cl₂ (150 mL). După 10 minute, se adaugă trietilamină (24 mL, 172 mmol) în CH₂Cl₂ (8 mL) în picătură în 30 minute, baia de răcire este îndepărtată și reacția este agitată peste noapte. Amestecul de reacție este concentrat sub vid, diluat cu CH₂Cl₂ suplimentar, și spălat cu 1 N HCl apos și apă. Faza organică este uscată (Na₂SO₄), filtrată, și concentrată. Materialul brut este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu eluand cu un gradient de 0-50% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu ca solid alb (11,1 g, 44,9 mmol, 63%). ES/MS (m/z): 246 (M-H).

Preparare 11**2,2,2-trifluoro-N-[(1S)-1-[4-(1-hidroxi-3-metil-butil)fenil]etil]acetamidă**

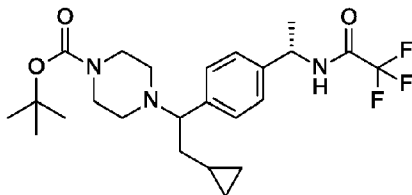
La o soluție de 2,2,2-trifluoro-N-[(1S)-1-(4-formilfenil)etil]acetamidă (1,72 g, 7,01 mmol) în THF (35 mL) răcită într-o baie de apă cu gheață se adaugă bromură de izobutilmagneziu (2 M în dietil eter, 7,0 mL, 14,0 mmol) și se agită timp de aproximativ 30 minute. Amestecul este stins cu clorură de amoniu saturată apoasă și partiționat între EtOAc și apă. Stratul organic este spălat cu clorură de sodiu saturată apoasă, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat, și concentrat pentru a da compusul din titlu ca un ulei (1,40 g, 4,15 mmol, 59%) care este utilizat fără purificare suplimentară. ES/MS (m/z): 302,0 (M-H).

Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda de Preparare 11.

Tabelul 3

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (M+H) (m/z)
12	2,2,2-trifluoro-N-[(1S)-1-[4-(1-hidroxi-3-metil-butil)fenil]etil]acetamidă		293 (M+NH ₄)

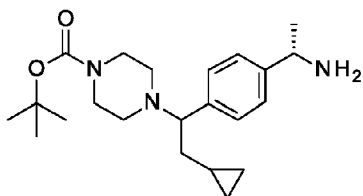
Preparare 13**terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]etil] piperazin-1-carboxilat**



- Se adaugă izopropoxid de titan(IV) (60 mL, 200 mmol) la o soluție de *N*-[(1S)-1-[4-(2-ciclopropilacetil)fenil]etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă (12,0 g, 40,1 mmol) și *tert*-butil piperazin-1-carboxilat (17,9 g, 96,1 mmol) în THF (80 mL) și amestecul este agitat la 60°C peste noapte. Amestecul este răcit la temperatura camerei și se adaugă MeOH (80 mL) urmat de adăugarea în porțiuni a cianoborohidruului de sodiu (5,3 g, 80 mmol). Amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 8 ore și apoi se adaugă apă și MeOH și amestecul este agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul este filtrat pentru a îndepărta solidele și solidele sunt clătite cu MeOH și apă. Filtratul este concentrat parțial pentru a îndepărta cea mai mare parte de MeOH și reziduul este extras cu EtOAc (?). Extractele organice combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu anhidru, filtrate, și concentrate sub presiune redusă. Materialul brut este purificat prin cromatografie pe coloană eluând cu un gradient de 0% până la 30% EtOAc în solvent B unde solventul B este 1:1 hexani:DCM pentru a da compusul din titlu (10,5 g, 56%) ca solid incolor. MS (m/z): 470,3 (M+H).

Preparare 14

tert-butil 4-[1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat

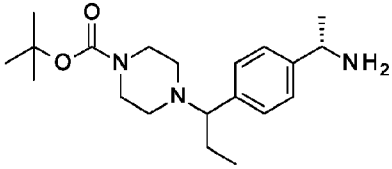


- Se adaugă hidroxid de potasiu apos (5 M, 69 mL, 350 mmol) la o soluție de *tert*-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat (32,24 g, 68,67 mmol) în EtOH (350 mL) și amestecul rezultat este agitat la temperatura camerei timp de 4 ore. EtOH este îndepărtat sub presiune redusă și la reziduu se adaugă bicarbonat de sodiu apos saturat și amestecul este extras cu DCM. Extractele organice combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu anhidru, filtrate, și concentrate sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (24,33 g, puritate 96,5% conținând 3,5% DCM rezidual, randament 92%) ca ulei vâcos incolor. MS (m/z): 374,3 (M+H).

Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda de Preparare 14.

Tabelul 4

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
15	<i>tert</i> -butil 4-[1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-3-metil-butil]piperazin-1-carboxilat		376
16	<i>tert</i> -butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 1		348
17	<i>tert</i> -butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 2		348

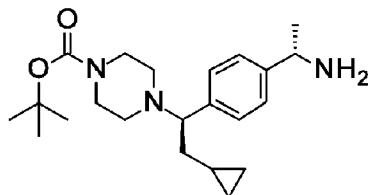
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
			

Preparare alternativă 14

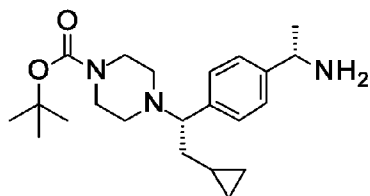
Se adaugă o soluție de hidroxid de potasiu (1,28 g, 22,9 mmol) în apă (4 mL) la o soluție de *terț*-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetyl)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat (2,15 g, 4,58 mmol) în EtOH (23 mL) și amestecul este agitat la temperatura camerei. După aproximativ 6 ore, amestecul este concentrat. Reziduul este partiționat între DCM și soluție saturată de bicarbonat de sodiu. Stratul organic este spălat cu apă și clorură de sodiu saturată apoasă, uscat pe sulfat de sodiu, filtrat, și concentrat pentru a da compusul din titlu ca un ulei care este utilizat fără purificare (1,73 g, 4,49 mmol, 98%). ES/MS (m/z): 374,2 (M+H).

Preparare 18

terț-butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1

**Preparare 19**

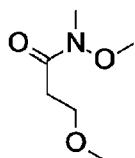
terț-butil 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 2



Un amestec 1:1 de *terț*-butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1 și *terț*-butil 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 2 (3,23 g) este dizolvat în MeOH (40 mL) și este separat în diastereomeri individuali prin cromatografie preparativă HPLC chirală utilizând următoarele condiții: coloană Chiralpak AD, 20 μm, (8 x 33 cm); volum de injecție 10 mL; eluent 100% MeOH cu 0,2% DMEA; lungime de undă de detecție 220 nm; debit 400 mL/min. Prepararea 12, *terț*-butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1, este obținută de la primul maxim de eluare ca ulei vâcos clar (1,50 g, 46%, >99% de). MS (m/z): 374,3 (M+H). Prepararea 13, *terț*-butil 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 2, este obținută de la al doilea maxim de eluare ca ulei vâcos clar (1,46 g, 45%, >98,2% de). MS (m/z): 374,3 (M+H).

Preparare 20

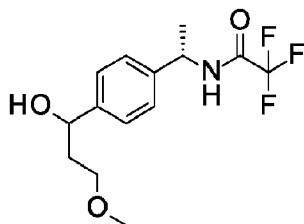
N,3-dimetoxi-*N*-metil-propanamidă



O soluție de acid 3-metoxipropanoic (62 g, 577,7 mmol) în DCM (1200 mL) este tratată încet în porțiuni cu 1,1'-carbonildiimidazol (103 g, 635,2 mmol) și agitată la temperatura camerei timp de 2 ore. Se adaugă clorhidrat de *N,O*-dimetilhidroxilamină (62 g, 635,6 mmol) și amestecul este agitat la temperatura camerei peste noapte. Amestecul este spălat cu apă (2×), 0,1M HCl apos (2×), și cu bicarbonat de sodiu apos saturat (2×), uscat pe sulfat de magneziu, filtrat și concentrat la sec pentru a da materialul brut. Materialul brut este cromatografiat pe gel de siliciu eluand cu un gradient de 20-40% acetonă în hexani. Uleiul rezultat este uscat peste noapte sub vid pentru a da compusul din titlu (69,5g, 81,7%). ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,72 (t, 2H), 3,2 (s, 3H), 3,38 (s, 3H), 3,7 (m, 5H).

Preparare 21

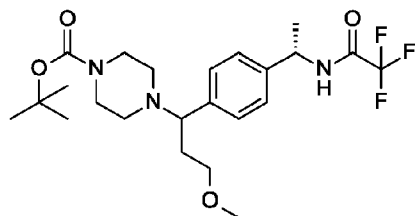
2,2,2-trifluoro-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-hidroxi-3-metoxi-propil)fenil]etil]acetamidă



2,2,2-trifluoro-*N*-[(1*S*)-1-[4-(3-metoxipropanoil)fenil]etil]acetamida (23,62 g, 73,98 mmol, 95% din masă) este dizolvată în MeOH (700 mL) și tratată cu borohidru de sodiu (5,6 g, 150 mmol). După agitare la temperatura camerei timp de 2 ore amestecul este tratat cu clorură de amoniu saturată apoasă și MeOH este evaporat. Materialul rezultat este partiționat între apă și EtOAc, separat și organicele combinate sunt uscate pe Na₂SO₄, filtrate, și concentrate la sec. Materialul brut este cromatografiat pe gel de siliciu eluand cu 40% EtOAc în hexani pentru a da compusul din titlu ca solid alb (17,82g, 79%). MS (m/z): 306 (M+H).

Preparare 22

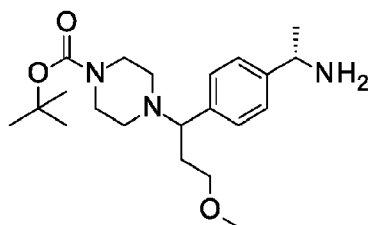
***tert*-butil 4-[3-metoxi-1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]propil] piperazin-1-carboxilat**



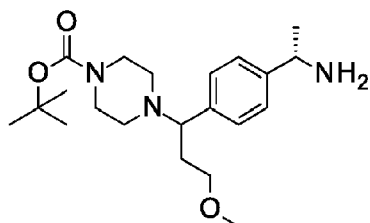
2,2,2-trifluoro-*N*-[(1*S*)-1-[4-(1-hidroxi-3-metoxi-propil)fenil]etil]acetamida (21,76g, 71,27 mmol) este dizolvată în DCM (350mL) și răcită la -10°C. Se adaugă clorură de tionil (26,12 g, 16 mL, 219,6 mmol) în picătură și reacția este agitată timp de 2 ore. Amestecul este concentrat la sec, redizolvat în DCM, și reconcentrat. Materialul brut este dizolvat în ACN (300 mL) și *t*-butil piperazin-1-carboxilat (26,55 g, 142,6 mmol), carbonat de potasiu (39,5 g, 286 mmol) și se adaugă iodură de potasiu (12,0 g, 72,3 mmol). Amestecul este încălzit la 80°C timp de 72 ore. Solidul alb rezultat este filtrat și spălat cu EtOAc. Filtratele combinate sunt spălate cu clorură de amoniu apoasă, uscate pe sulfat de magneziu, filtrate, și concentrate. Materialul brut este cromatografiat pe gel de siliciu eluand cu un gradient de 40-80% EtOAc în hexani pentru a da compusul din titlu ca spumă albă (29,63g, 88%). MS (m/z): 474 (M+H).

Preparare 23

***tert*-butil 4-[1-[4-(1*S*)-1-aminoetil]fenil]-3-metoxi-propil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1**

**Preparare 24**

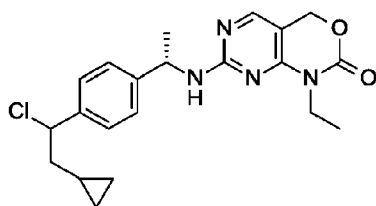
terț-butil 4-[1-[4-(1S)-1-aminoetil]fenil]-3-metoxi-propil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 2



La o soluție de *terț*-butil 4-[3-metoxi-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]propil]piperazin-1-carboxilat (29,60 g, 62,5 mmol) în EtOH (310 mL) se adaugă hidroxid de potasiu apos (63 mL, 5 M). Soluția este agitată timp de 4 ore la temperatura camerei și apoi amestecul este concentrat la sec. Reziduul brut este tratat cu apă și bicarbonat de sodiu apos saturat și extras cu DCM (3×). Extractele organice combinate sunt uscate pe sulfat de sodiu, filtrate, și concentrate pentru a da compusul din titlu (23,6g) care este dizolvat în MeOH (236 mL) și separat în diastereomeri individuali prin cromatografie SFC chirală utilizând următoarele condiții: coloană: Lux Celuloză-1, (5 x 25 cm); volum de injecție: 1 mL la fiecare 2,5 minute, eluent 15% MeOH/CO₂, lungime de undă de detecție 230 nm; debit 300 g/min; temperatura coloanei: 40°C; punct de setare BPR: 100 bar; temperatură BPR: 40°C. Compusul din titlu al Preparării 28 este obținut de la primul maxim de eluare ca ulei galben vâscos clar (10,1 g, 42,8%, 96,6% de). MS (m/z): 378 (M+H). Compusul Preparării 29 este izolat ca al doilea maxim de eluare ca ulei galben vâscos clar (10,3 g, 43,6%, 95,2% de). MS (m/z): 378 (M+H).

Preparare 25

7-[[[(1S)-1-[4-(1-cloro-2-ciclopropil-etil)fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă



Se adaugă clorură de tionil (0,23 mL, 3,219 mmol) la un amestec de 7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-hidroxi-etil)fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (432 mg, 1,03 mmol) și carbonat de potasiu (741 mg, 5,37 mmol) în DCM (20 mL) și amestecul este agitat la temperatura camerei timp de 20 minute. Amestecul este filtrat prin pământ de diatomee și concentrat pentru a da compusul din titlu (518 mg, 1,07 mmol, 100%) ca spumă albă, care este utilizat fără purificare suplimentară. ES/MS (m/z): 401,2/403,2 (M+H).

Următorii compuși sunt preparați în mod esențial prin metoda de Preparare 25.

Tabelul 5

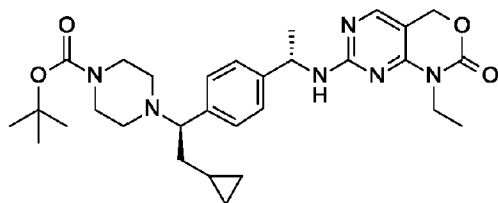
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
26	N-[(1S)-1-[4-(1-cloro-2-ciclopropil-etil) fenil]etil]-2,2,2-trifluoro-acetamidă		318

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
27	N-[(1S)-1-[4-(1-cloro-3-metil-butil)fenil]etil]-2,2,2-trifluoroacetamidă		320
28	N-[(1S)-1-[4-(1-cloropropil)fenil]etil]-2,2,2-trifluoroacetamidă		311 (M+NH ₄)

Preparare 29

terț-butil 4-[(1R)-2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3] oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat

5



- La o soluție de *terț*-butil 4-[(1R)-1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropil-etil]piperazin-1-carboxilat (864 mg, 3,35 mmol), și 1-etil-7-(metilsulfonil)-1,4-dihidro-2H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (1,14 g, 3,05 mmol), în DMSO (15 mL) se adaugă CsF (1,39 g, 9,15 mmol) și DIPEA (0,80 mL, 4,6 mmol). Amestecul este agitat la 60°C timp de 1,5 ore. Amestecul este răcit la temperatura camerei, diluat cu EtOAc, și spălat cu apă (2×). Spălările apoase combinate sunt extrase cu EtOAc și extractele organice combinate sunt uscate (Na₂SO₄), filtrate, și concentrate la sec. Produsul brut rezultat este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu eluând cu un gradient de 55% până la 95% EtOAc în hexani pentru a da compusul din titlu ca solid incolor (1,47 g, 88%). MS (m/z): 551,3 (M+H).

Următorii compuși sunt preparați în mod esențial prin metoda de Preparare 29.

Tabelul 6

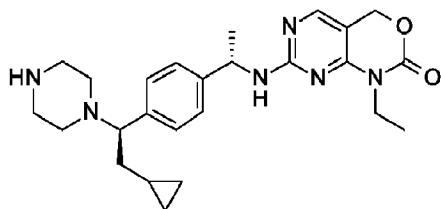
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
30	<i>terț</i> -butil 4-[(1S)-2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat,		551
31	<i>terț</i> -butil 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metoxipropil]piperazin-1-carboxilat (diastereomer 1)		555
32	<i>terț</i> -butil 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-		555

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
	d)[1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metoxi-propil]piperazin-1-carboxilat (diastereomer 2)		
33	terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-metil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat (diastereomer 1)		537
34	terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-metil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat (diastereomer 2)		537
35	terț-butil 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metil-butil]piperazin-1-carboxilat		553
36	terț-butil 4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 1		525
37	terț-butil 4-[(1R/S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 2		525
38	7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-hidroxi-etil)fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă		383

Preparare 39

7-[[[(1S)-1-[4-(1R)-2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă

5



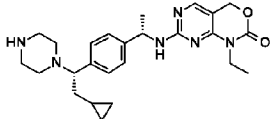
Se adaugă acid clorhidric (95 mL, 5,5 M în izopropanol, 520 mmol) în picătură la o soluție de terț-butil 4-[(1R)-2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat (29,45 g, 53,48 mmol) în EtOAc (570 mL) la 40°C. Amestecul este lăsat să se agite 3 ore, la temperatura camerei, și apoi se daigă apă (300 mL). Straturile sunt separate și stratul organic este extras cu apă (2 × 150 mL). PH-urile extractelor apoase combinate sunt ajustate la pH 10 prin adăugarea de 5 N NaOH conducând la formarea a unui solid incolor. Solidul este colectat prin filtrare, spălat cu apă, și aer uscat pentru a da compusul din titlu (25,18 g, 99%) ca solid incolor. MS (m/z): 451,2 (M+H).

10

15

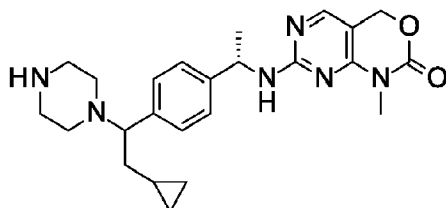
Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda de Preparare 39.

Tabelul 7

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
40	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-Ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă		451

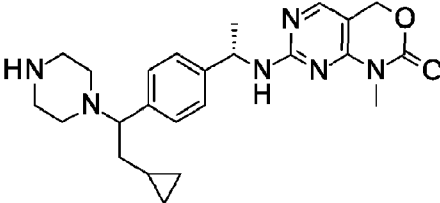
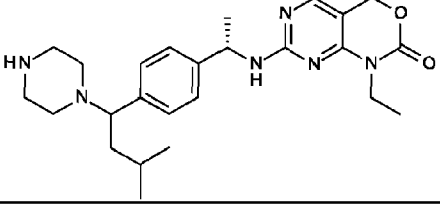
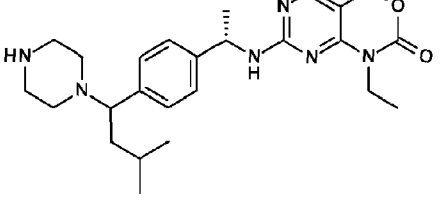
Preparare 41

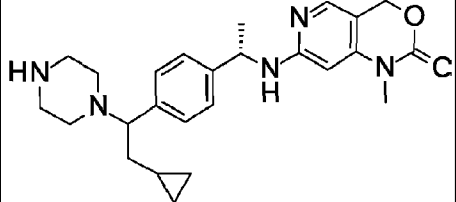
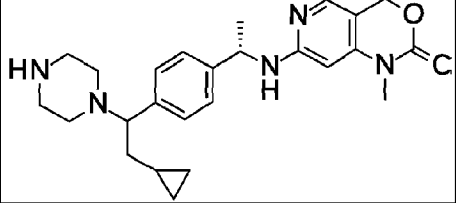
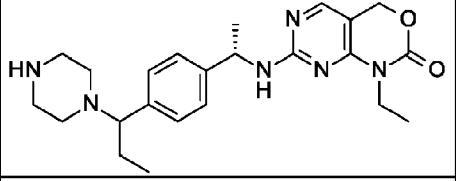
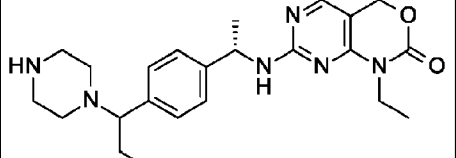
- 5 7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil)fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 1



- 10 Terț-butilul 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-metil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1 (245 mg, 0,46 mmol) este dizolvat în DCM (2,5 mL). Se adaugă TFA (0,7 mL, 9 mmol) și reacția este agitată la temperatura camerei timp de 90 de minute. Amestecul este stins cu 20% aq K₂CO₃ și extras cu DCM (3?). Extractele organice combinate sunt uscate pe Na₂SO₄, filtrate, și concentrate la sec pe vid înaintat peste noapte pentru a da compusul din titlu ca spumă albă, (196 mg, 88,5%). MS (m/z): 437 (M+H).
- 15 Următorii compuși sunt preparați în mod esențial prin metoda de Preparare 41.

Tabelul 8

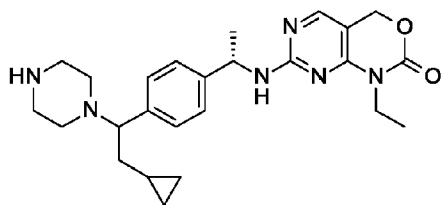
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
42	7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil)fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 2		437
43	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-(3-metil-1-piperazin-1-il-butil)fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1		453
44	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-(3-metil-1-piperazin-1-il-butil)fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2		453
45	7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil)fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1		436

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
			
46	7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil)fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2		436
47	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-piperazin-1-ilpropil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1		425
48	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-piperazin-1-ilpropil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2		425

Preparare 49

7-[[[(1S)-1-[4-(2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil)fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă

5

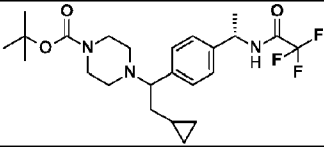
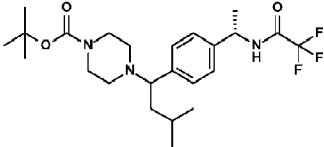
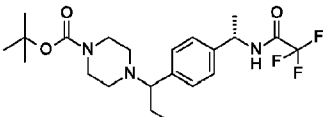


10 Un amestec de 7-[[[(1S)-1-[4-(1-cloro-2-ciclopropil-etil)fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (518 mg, 1,07 mmol), carbonat de potasiu (445 mg, 3,217 mmol), iodură de sodiu (161 mg, 1,07 mmol) și piperazină (277 mg, 3,22 mmol) în ACN (3 mL) este încălzit într-o fiolă etanșată până la 70°C. După 8 ore, amestecul este răcit la temperatura camerei, diluat cu EtOAc, filtrat prin pământ de diatomee, și concentrat. Materialul brut este purificat pe gel de siliciu eluând cu un gradient de 1% până la 7% 3 M NH₃/MeOH în DCM pentru a da compusul din titlu (306 mg, 0,66 mmol, 62%) ca solid alb. ES/MS (m/z): 451,2 (M+H).

15 Următorii compuși sunt preparați în mod esențial prin metoda de Preparare 49 utilizând piperazina protejată adecvată.

Tabelul 9

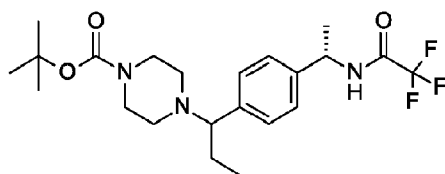
Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
50	terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat		470

Nr. prep.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
			
51	<i>terț</i> -butil 4-[3-metil-1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]butil]piperazin-1-carboxilat		472
52	<i>terț</i> -butil 4-[1-[4-[(1 <i>S</i>)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat		444

Preparare 53

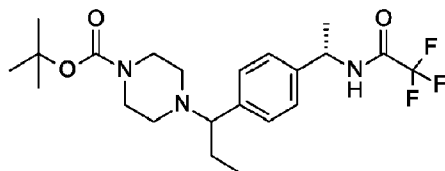
terț-butil 4-[1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 1

5

**Preparare 54**

terț-butil 4-[1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]fenil]propil]piperazin-1-carboxilat, izomer 2

10



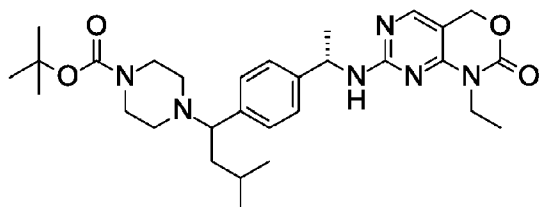
15 *Terț*-butil 4-[1-[4-[(1*S*)-1-[(2,2,2-trifluoroacetil)amino]etil]-fenil]propil]piperazin-1-carboxilat (29,2 g, 65,8 mmol) este dizolvat în MeOH (584 mL) și rezolvat prin cromatografie SFC chirală utilizând următoarele condiții: coloană: Chiralpak AD-H, 5x25 cm; eluent 85/15 CO₂/MeOH cu 0,5% dimetiletilamină; debit 300 g/min; lungime de undă de detecție 230 nm; temperatura coloanei 40°C; punct de setare BPR 100 bar; temperatură solvent 40°C. Izomerul 1 este izolat ca primul maxim de eluare (14,15 g, 31,9 mmol). ES/MS (m/z): 444 (M+H). Izomerul 2 este izolat ca al doilea maxim de eluare (13,87 g, 31,3 mmol). ES/MS (m/z): 444 (M+H).

20

Preparare 55

terț-butil 4-[1-[4-[(1*S*)-1-[(1-etil-2-oxo-4*H*-pirimido[4,5-*d*][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metil-butil]piperazin-1-carboxilat, izomer 1

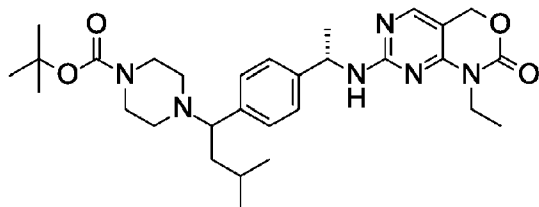
25



Preparare 56

terț-butil 4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino] etil]fenil]-3-metil-butil]piperazin-1-carboxilat, izomer 2

5

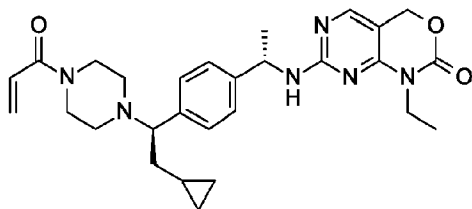


Terț-butilul

4-[1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metil-butil]piperazin-1-carboxilat (2,6 g, 4,70 mmol) este dizolvat în 4:1 izopropanol:cloroform (50 mL) și rezolvat prin cromatografie SFC chirală utilizând următoarele condiții: coloană: Chiralpak AD-H, 5x25 cm; volum de injecție 1 mL; eluent 75/25 CO₂/IPA cu 0,5% dimetiletilamină; debit 280 g/min; lungime de undă de detecție 240 nm; temperatura coloanei 40°C; punct de setare BPR 100 bar; temperatură solvent 40°C. Prepararea 45 este izolată ca primul maxim de eluare (1,02 g, 1,89 mmol). ES/MS (m/z): 553,4 (M+H). Prepararea 46 este izolată ca al doilea maxim de eluare (1,05 g, 1,90 mmol). ES/MS (m/z): 553,4 (M+H).

Exemplul 1

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă



20

Se adaugă clorură de acrilol (305 μL, 3,75 mmol, în 2 mL DCM) în picătură la o soluție de 7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-ciclopropil-1-piperazin-1-il-etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (1,73 g, 3,26 mmol) în DCM la -78°C. După 2 minute la -78°C, se adaugă câteva picături de MeOH urmate de bicarbonat de sodiu apos saturat și amestecul este lăsat să se încălzească la temperatura camerei. Se adaugă DCM, straturile sunt separate, și stratul apos este extras cu DCM. Extractele organice combinate sunt uscate (Na₂SO₄), filtrate, și concentrate la sec. Produsul brut rezultat este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu (25% până la 40% Solvent A în Solvent B unde Solvent A este 10% MeOH/acetonă și Solvent B este hexani) pentru a da compusul din titlu ca solid incolor (1,16 g, 70%). MS (m/z): 505,3 (M+H).

Următorii compuși sunt preparați în mod esențial prin metoda din exemplul 1 (în care Exemple 9 și 10 nu sunt părți ale invenției).

Tabelul 11

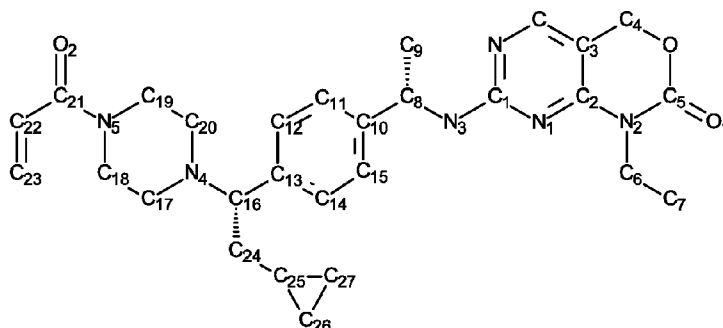
Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/M (m/z) (M+H)	S
2	7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă		505	
3	7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 1		491	
4	7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-metil-4H-		491	

Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/M S (m/z) (M+H)
	pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 2		
5	7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă		505
6	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)butil]fenil]etil]amino]pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă	-4H- 	507
7	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)butil]fenil]etil]amino]pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1	-4H- 	507
8	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)butil]fenil]etil]amino]pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2	-4H- 	507
9	7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1		490
10	7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2		490
11	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1	]-4H- 	479
12	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[(1R/S)-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2	]-4H- 	479

Determinarea structurii cristaline cu raze X a IDH1 în complex cu 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă.

Structura cristalină a IDH1 în complex cu 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă este determinată din datele de difracție cu raze X colectate la linia fasciculului sincrotron APS 31-ID operată la Advanced Photon Source la laboratorul Argonne National Laboratory, Argonne, IL 60439. Proteina IDH1 cu o mutație R132H este disponibilă comercial din multiple surse. Alternativ, proteina IDH1 R132H poate fi izolată dintr-o linie celulară disponibilă comercial care găzduiește mutația prin tehnici bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit de către cei calificați în domeniu. Cristalele sunt obținute din tăvi de așezare a picăturilor echilibrate la 21°C cu proteină IDH1 cu mutația R132H la o concentrație de 15 mg/ml într-un tampon conținând 10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM clorură de sodiu, 10% glicerol, 5 mM ditiotritol și 2 mM 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, și amestecate cu un volum egal de soluție rezervor conținând 100mM Bis Tris pH 5,5% DMSO, 22% PEG 3350 și 200mM sulfat de amoniu. Cristalele sunt udate peste noapte într-o soluție conținând 3 mM de 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, înainte de a fi transferate la o soluție suplimentată cu 22% etilen glicol și congelate rapid pentru colectarea datelor. Datele de difracție până la rezoluția de 2,8 Å sunt colectate cu radiații cu raze X de lungime de undă 0,9793 Å. Cristalele aparțin grupului spațial P4₃2₁2 cu parametrii celulari a=82,74 Å, b=82,74 Å, c=299,4 Å, α=β=γ=90°. Structura este determinată de înlocuirea moleculară și conținutul unei molecule dimer de IDH1. Diferența densității electronilor se potrivește cu cea calculată după ce modelarea proteinei IDH1 a avut o densitate clară pentru două molecule legate de 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă.

Stereochimia 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-unei este determinată din densitatea electronilor, și ambele molecule de 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă sunt modelate și structura co-complexă rafinată la factori R de Rfuncționare=0,192 și R_{liber}=0,228.



Tabelul 12

Coordonatele 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-unei.

ATOM	X	Y	Z
O2	48,364	1,353	-2,648
C21	49,136	0,711	-1,964
C22	48,932	-0,779	-1,799
C23	47,694	-1,239	-2,530
N5	50,174	1,294	-1,330
C18	50,422	2,738	-1,428
C17	51,848	3,008	-1,849
C19	51,126	0,603	-0,449
C20	52,568	0,906	-0,834
N4	52,797	2,388	-0,868
C16	54,242	2,810	-1,061
C24	55,094	2,321	0,113

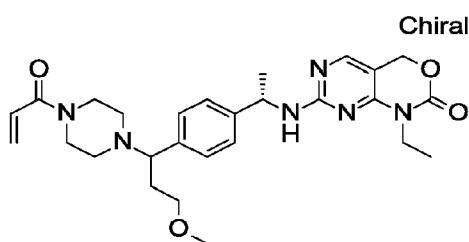
Coordonatele 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil] etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onei.

ATOM	X	Y	Z
C25	56,411	3,091	0,050
C27	57,062	3,523	1,306
C26	56,432	4,534	0,413
C13	54,761	2,408	-2,428
C12	55,212	1,125	-2,730
C11	55,701	0,819	-3,988
C14	54,812	3,365	-3,432
C15	55,295	3,057	-4,691
C10	55,742	1,778	-4,997
C8	56,243	1,464	-6,405
C9	55,107	1,279	-7,400
N3	57,128	0,291	-6,469
C1	58,372	0,310	-5,968
N	59,104	-0,809	-6,086
N1	58,775	1,474	-5,441
C2	60,041	1,523	-5,009
N2	60,425	2,651	-4,254
C6	59,506	3,796	-4,105
C7	58,569	3,631	-2,901
C5	61,546	2,595	-3,438
O1	61,736	3,358	-2,523
O	62,437	1,605	-3,629
C4	62,347	0,684	-4,739
C3	60,923	0,429	-5,132
C	60,369	-0,717	-5,655

Exemplul 13

1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metoxi-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 1

5

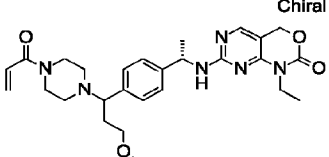


- 10 4-[(1S)-1-[4-[(1S)-1-[(1-etil-2-oxo-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]-3-metoxi-propil]piperazin-1-carboxilat (1,372 g, 2,473 mmol) este dizolvat în DCM (15 mL) și se adaugă TFA (10 mL, 15,08 g, 132,3 mmol). Reacția este agitată timp de 1 oră și apoi concentrată la sec. Materialul brut este dizolvat în DCM (12 mL) și DIPEA (1,25 mL, 7,17 mmol) și amestecul este răcit la -78 grade. Se adaugă clorură de acrilil (0,18 mL, 0,20 g, 2,2 mmol) în picături. După 10 minute, se adaugă câteva picături de metanol pentru a stinge clorura de acrilil rămasă și reacția este concentrată la sec (rece). Materialul brut este cromatografiat pe
- 15 gel de siliciu eluand cu un gradient de 50-70% acetonă în hexani pentru a da compusul din titlu ca spumă albă (867mg, 73%). MS (m/z): 509 (M+H).

Următorul compus este preparat în mod esențial prin metoda din exemplul 13.

Tabelul 13

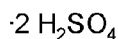
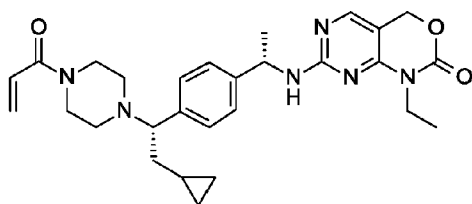
Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
14	1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[3-metoxi-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, diastereomer 2		509

Nr. ex.	Denumire chimică	Structură	ES/MS (m/z) (M+H)
			

Exemplul 15

disulfat de 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă

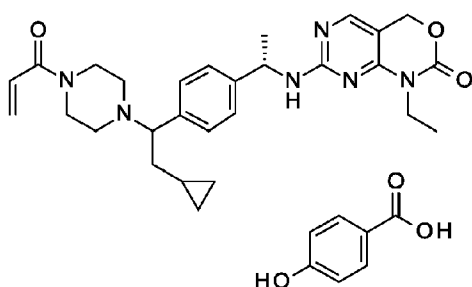
5



- 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil] amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-ona (188 mg) este plasată în 5 mL de acetonă în timp ce se agită la 1000 rpm/60°C. Mostra este o soluție clară. Se adaugă 45 µL de acid sulfuric în picături (dilat în 2 mL de acetonă). O suspensie albă groasă rezultă după câteva picături. După adăugarea a jumătate din acidul sulfuric, consistența suspensiei se modifică. Adăugarea celei de a doua jumătăți de acid sulfuric este făcută încet, în picături. Suspensia devine puțin gumoasă înainte de a se transforma într-o suspensie albă strălucitoare care curge liber de solid. Căldura este oprită la placă după 30 minute, și mostra răcită la temperatura camerei, dând o suspensie groasă de solid alb. Solidul alb este izolat prin filtrare în vid. Turta rezultată este un solid alb strălucitor. Mostra este uscată pe loc cu filtru sub curent de aer timp de 20 minute, apoi la 70°C într-un cuptor cu vid peste noapte. S-au recuperat 266 mg (randament 96,9%).

Exemplul 16

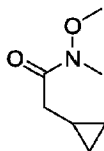
- acid 4-hidroxibenzoic de 7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă**



- Se adaugă acid 4-hidroxibenzoic (0,023 g, 0,165 mmol) la o soluție de 7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă (84 mg, 0,165 mmol) în diclorometan (5 ml). După o agitare de 5 minute, solventul este evaporat încet sub o curgere de azot. Solidul rezultat este uscat mai departe sub vid pentru a da 7-[[[(1S)-1-[4-[2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă 4-hidroxibenzoat (105 mg, 0,1617 mmol) ca solid alb. MS (m/z): 423,2 (M+H).

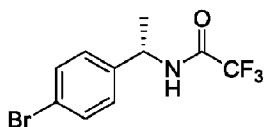
Preparare 57

2-ciclopropil-N-metoxi-N-metilacetamidă



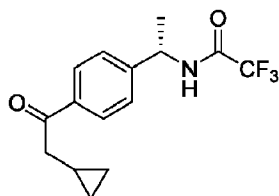
Intr-un balon agitat de 500 mL cu fund rotund se încărcă diclorometan (160 mL, 8 volume) și 1,1'-carbonildiimidazol (35,63g, 1,1 echiv.). Amestecul eterogen este răcit la 15°C și la amestec se încărcă o soluție de acid 2-ciclopropilacetic (20,0g, 1,0 echiv.) in diclorometan (40 mL, 2 volume) la o rată care să controleze temperatura internă sub 20°C. Soluția rezultată este încălzită la 25°C și agitată timp de 2 ore. Soluția este apoi răcită la 15°C și se încărcă clorhidrat de *N,O*-dimetil hidroxilamină (21,43g, 1,1 echiv.) în porții, menținând temperatura internă sub 20°C. Amestecul eterogen rezultat este încălzit la 25°C și agitat timp de 15 ore. Amestecul de reacție este apoi diluat cu apă (160 mL, 8 volume) și agitat timp de 15 minute. Agitarea este oprită și stratul apos mai scăzut este separat. Stratul apos rezultat este extras cu diclorometan de încă două ori (100 mL, 5 volume x 2) și straturile organice sunt combinate. Stratul organic combinat este spălat de două ori cu 1,5 N HCl (100 mL, 5 volume x 2). Stratul organic este apoi spălat de două ori cu 10% bicarbonat de sodiu apos (100 mL, 5 volume x 2). Stratul organic este apoi spălat cu apă (100 mL, 5 volume) urmată de clorură de sodiu saturată apoasă (100 mL, 5 volume). Stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru (1,0% g/g). Masa este filtrată și spălată cu diclorometan (20 mL, 1 volum) și apoi concentrată sub vid. Solidul rezultat este uscat sub vid înaintat timp de 5 ore pentru a obține compusul din titlu (25,9g, randament 90,5%). ES/MS *m/z* 144,1 (M+H).

Sinteză alternativă a Preparării 6
(*S*)-*N*-(1-(4-bromofenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă



Intr-un balon agitat de 250 mL cu fund rotund este încărcat diclorometan (100 mL, 10 volume) urmat de (*S*)-(-)-1-(4-bromofenil)etilamină (10,0g, 1,0 echiv.). Soluția este răcită la 0°C și la soluția răcită se încărcă încet anhidridă trifluoroacetică (13,12g, 1,25 echiv.), menținând temperatura internă sub 5°C. Amestecul eterogen rezultat este agitat la 0°C timp de 2 ore, timp în care se încărcă încet trimetilamină (12,64g, 2,5 echiv.), menținând temperatura internă sub 5°C. Amestecul este agitat timp de încă o oră suplimentară și apoi stins prin adăugarea de apă (30 mL, 3 volume). Amestecul bifazic este încălzit la 25°C și agitat timp de 30 minute. Straturile sunt apoi separate și stratul apos este extras suplimentar de două ori cu diclorometan (50 mL, 5 volume x 2). Straturile organice combinate sunt spălate cu clorură de sodiu saturată apoasă (50 mL, 5 volume) și uscate pe sulfat de sodiu anhidru (1g%). Soluția uscată este filtrată și spălată cu diclorometan (10 mL, 1 volum) și soluția este concentrată sub vid pentru a da un solid brut alb. Solidul brut este suspendat în eter de petrol (100 mL, 10 volume) timp de 2 ore la 25°C și solidul este colectat prin filtrare. Solidul umed este uscat sub vid la 40°C timp de 8 ore pentru a obține compusul din titlu (13,3 g, randament 90%). ES/MS *m/z* 295,3 (M+H).

Preparare 58
(*S*)-*N*-(1-(4-(2-ciclopropilacetil)fenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă

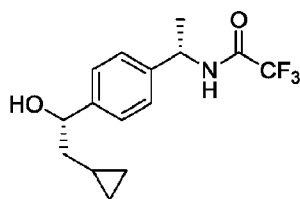


La un vas de reacție de 10 L cu agitare la partea superioară se încărcă metil *tert*-butil eter (1500 mL, 15 volume). La soluția agitată se încărcă (*S*)-*N*-(1-(4-bromofenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă (100g, 1,0 echiv.). Amestecul eterogen este agitat la 25°C timp de 30 minute și apoi se încărcă tetrahidrofuran (500 mL, 5 volume). Soluția omogenă rezultată este răcită la -83°C. Se adaugă încet la soluție *n*-butil litu (297 mL, 2,2 echiv.) menținând temperatura sub -78°C și soluția rezultată este agitată la -83°C timp de 1,5 ore. La soluția răcită se adaugă o soluție

de 2-ciclopropil-N-metoxi-N-metilacetamidă (53,19g, 1,1 echiv.) în metil *terț*-butil eter (200 mL, 2 volume), menținând temperatura internă sub -78°C. Soluția rezultată este agitată la -83°C timp de 1,5 ore, în care timp soluția este încălzită la -30°C și stinsă prin adăugarea de clorură de amoniu saturată apoasă (5 L, 5 volume). Amestecul de reacție stins este încălzit la 25°C și straturile sunt separate. Stratul apos este extras cu metil *terț*-butil eter (500 mL, 5 volume). Straturile organice combinate sunt spălate cu apă (500 mL, 5 volume), urmată de clorură de sodiu saturată apoasă (500 mL, 5 volume) și apoi uscate pe sulfat de sodiu anhidru (50g, 0,5% g/g). Masa este filtrată și spălată cu metil *terț*-butil eter (50 mL, 0,5 volume). Soluția rezultată este concentrată sub vid până când a rămas aproximativ 1 volum de soluție. Se încarcă eter de petrol (1500 mL, 15 volume) la amestecul concentrat și suspensia rezultată este agitată sub 30°C timp de 2 ore. Solidul este colectat prin filtrare și uscat sub vid la 40°C timp de 8 ore pentru a obține compusul din titlu (65,9 g, randament 67%). ES/MS m/z 298,0 (M-H).

Preparare 59

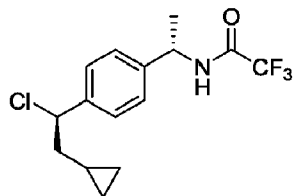
N-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-ciclopropil-1-hidroxietil)fenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă



Intr-un reactor hidrogenator se încarcă etanol absolut (7,89 kg, 10 volume). La soluția agitată se încarcă (*S*)-*N*-(1-(4-(2-ciclopropilacetil)fenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă (1,0 kg, 1,0 echiv.). La soluție se încarcă o soluție *terț*-butoxid de potasiu (1,0 M în *t*BuOH, 0,41 kg, 0,5 volume) menținând temperatura internă sub 30°C. La soluție se încarcă apoi (*R*)-RUCY®-XyIBINAP (0,0675 kg, 0,017 echiv.). Hidrogenatorul este purjat cu gaz de hidrogen de două ori, în timp ce se agit la 25°C. După purjare, soluția este agitată sub presiune de 4,5 kg de hidrogen la 25°C timp de 5 ore. După 5 ore, soluția este aerisită și apoi concentrată la un ulei cu vid sub 42°C. Uleiul este dizolvat în metil *terț*-butil eter (11,115 kg, 15 volume) și apoi concentrată la un ulei cu vid sub 45°C. Uleiul este dizolvat în metil *terț*-butil eter (11,115 kg, 15 volume) și apoi concentrat la un ulei cu vid sub 45°C. La ulei se încarcă metil *terț*-butil eter (22,23 kg, 30 volume) la 25°C. Soluția rezultată este spălată cu apă (15,0 kg, 15 volume) urmată de o soluție de NaCl în apă (5,4kg NaCl în 15,0 L apă). Stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru (1,5kg, 1,5 g/g) și apoi filtrat și spălat cu metil *terț*-butil eter (1,112 kg, 1,5 volume). La soluția filtrată se încarcă cărbune activat (0,3 kg, 0,3 g/g) și amestecul este agitat și încălzit la 40°C timp de 2 ore. Amestecul este apoi filtrat și spălat cu metil *terț*-butil eter (1,112 kg, 1,5 volume). Soluția filtrată este concentrată la un ulei cu vid sub 45°C. Uleiul este dizolvat în eter de petrol (9,84 kg, 15 volume) și concentrat la un ulei cu vid sub 45°C. Uleiul este dizolvat în eter de petrol (9,84 kg, 15 volume) și concentrat la un ulei cu vid sub 45°C. La ulei se încarcă eter de petrol (19,68 kg, 30 volume) și amestecul este agitat la 30°C timp de 3 ore și solidul rezultat este colectat prin filtrare și spălat cu eter de petrol (9,84 kg, 15 volume). Solidul izolat este uscat sub vid la 40°C timp de 5 ore pentru a obține compusul din titlu (0,79 kg, 79%). ES/MS m/z 300,0 (M-H).

Preparare 60

N-((*S*)-1-(4-((*R*)-1-cloro-2-ciclopropiletil)fenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă

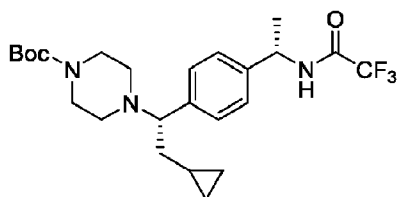


Un reactor este încărcat cu metil *terț*-butil eter (4,45 kg, 6 volume) și *N*-((*S*)-1-(4-((*S*)-2-ciclopropil-1-hidroxietil)fenil)etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă (1,0 kg, 1,0 echiv.). Soluția este răcită la 10°C și se încarcă încet 1-formilpirolidină (0,066 kg, 0,2 echiv.) menținând temperatura internă sub 13°C. La soluție se încarcă apoi încet clorură de benzoil (0,56 kg, 1,2 echiv.) menținând temperatura internă sub 13°C. Soluția rezultată este încălzită la 25°C și agitată timp de până la 36 ore (reacția poate fi monitorizată în timpul cursului reacției și dacă se stinge, poate fi încărcată suplimentar cu 1-formilpirolidină și clorură de benzoil). Reacția completă este apoi concentrată la

un ulei cu vid sub 40°C. Uleiul este răcit la 15°C și apoi stins cu o soluție apoasă 10% de bicarbonat de sodiu (22,0 kg, 20 volume) și agitat timp de 3 ore la 25°C. La amestecul bifazic se încărcă eter de petrol (6,56 kg, 10 volume). Stratul organic este separat. Stratul apos este extras cu eter de petrol (6,56 kg, 10 volume). Straturile organice combinate sunt spălate cu bicarbonat de sodiu 10% apos (5,0 L, 5 volume) de trei ori. Stratul organic este apoi spălat cu apă (5,0 L, 5 volume) urmată de saramură (5,0 L, 5 volume). Stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru (0,5 kg, 0,5 g/g). Amestecul este apoi filtrat și spălat cu eter de petrol (0,33 kg, 0,5 volume). Filtratul este concentrat la un ulei cu vid sub 40°C. Uleiul este dizolvat în acetonitril (3,93 kg, 5 volume) și concentrat la un ulei cu vid sub 40°C. Uleiul este dizolvat în acetonitril (3,93 kg, 5 volume) și concentrat la un ulei cu vid sub 40°C. Uleiul este dizolvat în acetonitril (7,86 kg, 10 volume) și soluția obținută a compusului din titlu este utilizată brut în etapa următoare. ES/MS m/z 318,0 (M-H).

Preparare 61

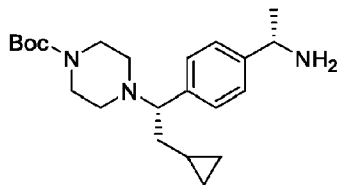
terț-butil 4-((S)-2-ciclopropil-1-(4-((S)-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)etil)fenil) etil)piperazin-1-carboxilat



La soluția obținută anterior de *N*-((S)-1-(4-((R)-1-cloro-2-ciclopropiletil)fenil) etil)-2,2,2-trifluoroacetamidă se încărcă *N*-Boc-piperazină (0,924 kg, 1,5 echiv.) urmată de bicarbonat de sodiu (1,1 kg, 4,0 echiv.). Amestecul rezultat este încălzit la 85°C timp de 60 ore. Notă: reacția este eşantionată la fiecare 24 ore și după fiecare eşantionare se ia o mostră, reacția este încărcată cu o cantitate suplimentară de *N*-Boc-piperazină (0,31 kg, 0,5 echiv.). Odată completă, reacția este concentrată cu vid sub 45°C pentru a da un ulei. Uleiul este diluat cu apă (10,0 kg, 10 volume) și metil terț-butil eter (7,41 kg, 10 volume). Amestecul bifazic rezultat este separat și stratul apos este extras cu metil terț-butil eter (7,41 kg, 10 volume). Straturile organice combinate sunt extrase cu 30% acid citric (5,0 L, 5 volume) de cinci ori. Straturile apoase combinate sunt spălate de două ori cu eter de petrol (6,56 kg, 10 volume). Stratul apos este adus la un pH de 9 cu adăugare de carbonat de sodiu (aproximativ 25,0 kg, 25 g/g) la 15°C. Stratul apos bazificat este extras cu metil terț-butil eter (7,41 kg, 10 volume). Straturile organice combinate sunt spălate cu apă (5,0 L, 5 volume) și saramură (5,0 L, 5 volume). Stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru (0,5 kg, 50% g/g). Amestecul este filtrat și spălat cu metil terț-butil eter (0,37 kg, 0,5 volume). Filtratul este concentrat la un ulei cu vid sub 40°C. Uleiul rezultat este dizolvat în etanol absolut (3,95 kg, 5 volume) și soluția brută a compusului din titlu este utilizată direct în etapa următoare. ES/MS m/z 374,3 (M+H-CF₃CO).

Preparare 62

terț-butil 4-((S)-1-(4-((S)-1-aminoetil)fenil)-2-ciclopropiletil)piperazin-1-carboxilat



La soluția anterior obținută de terț-butil 4-((S)-2-ciclopropil-1-(4-((S)-1-(2,2,2-trifluoroacetamido)etil)fenil)etil)piperazin-1-carboxilat se încărcă etanol absolut (3,7 kg, 3,7 g/g). Soluția este răcită la 20°C și la ea se încărcă hidroxid de potasiu 1M apos (0,168 kg KOH în 3,0 kg apă). Amestecul rezultat este agitat la 25°C timp de 10 ore și apoi stins prin adăugarea lentă de acid citric apos 30% (5,0 kg, 5 g/g) menținând temperatura internă sub 30°C. La soluția stinsă se încărcă metil terț-butil eter (7,41 kg, 7,41 g/g). Straturile sunt separate și stratul organic este extras cu acid citric apos 30% (5,0 kg, 5 g/g). Stratul apos este adus la un pH de 8 cu adăugare de carbonat de sodiu (aproximativ 25,0 kg, 25 g/g) la 15°C. Stratul apos bazificat este extras de două ori cu acetat de etil (7,41 kg, 7,41 g/g). Straturile organice combinate sunt spălate cu apă (5,0 kg, 5 g/g) și apoi saramură (5,0 kg, 5 g/g). Stratul organic este uscat pe sulfat de sodiu anhidru (0,5 kg,

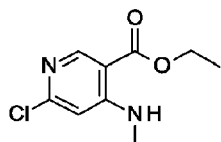
50g%), apoi filtrat și spălat cu acetat de etil (0,37 kg, 0,37 g/g). Soluția este concentrată la un ulei cu vid sub 45°C. Uleiul rezultat este dizolvat în alcool izopropilic (2 L, 2 volume), și soluția rezultată este concentrată la un ulei cu vid sub 45°C. Uleiul rezultat este dizolvat în alcool izopropilic (1,2 L, 1,2 volume) și soluția brută a compusului din titlu este utilizată direct în etapa următoare de purificare. ES/MS m/z 374,2 (M+H).

La un balon de 1000 mL cu fund rotund se încărcă o soluție de *terț*-butil 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoetil)fenil)-2-ciclopropiletil)piperazin-1-carboxilat (30,0 g, 1,0 echiv.) în alcool izopropilic (270 mL, 9 volume). La soluția agitată la 20-30°C se încărcă acid L-dibenzoil tartric (L-DBTA, 34,5 g, 1,2 echiv.). Soluția este agitată la 20-30°C timp de 2-4 ore. Suspensia rezultată este lăsată să se agite peste 8-12 ore la 20-30°C. La suspensia ușoară se încărcă MTBE (300 mL, 10 volume). Suspensia rezultată este lăsată să se agite și să se îngroașe la 20-30°C peste 12-16 ore. Solidul este apoi colectat prin filtrare și spălat cu MTBE (150 mL, 5 volume). Solidul este uscat sub presiune redusă la 45-55°C timp de 12 ore pentru a da sarea acidului tartaric L-dibenzoil de *terț*-butil 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoetil)fenil)-2-ciclopropiletil)piperazin-1-carboxilat ca solid alb (48,8 g, randament 83%, >98:2 dr).

La un balon de 1000 mL cu fund rotund se încărcă sarea acidului tartaric L-dibenzoil de *terț*-butil 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoetil)fenil)-2-ciclopropiletil)piperazin-1-carboxilat (40,0 g, 1,0 echiv.) urmată de diclorometan (400 mL, 10 volume). La soluția agitată la 15-25°C se încărcă o soluție apoasă de 10% Na₂CO₃ (suficientă pentru a aduce pH-ul până la 8-10, aproximativ 6-8 volume). Amestecul bifazic este agitat timp de 1 oră la 15-25°C și apoi straturile sunt separate într-o pâlnie separatoare. La stratul organic se încărcă DMSO (240 mL, 6 volume). Soluția este concentrată sub presiune redusă sub 40°C pentru a îndepărta diclorometanul. Soluția de *terț*-butil 4-((*S*)-1-(4-((*S*)-1-aminoetil)fenil)-2-ciclopropiletil)piperazin-1-carboxilat fără baze în DMSO este apoi utilizată direct în etapa următoare.

25 Preparare 63

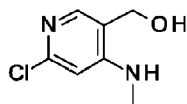
Etil 6-cloro-4-(metilamino)piridin-3-carboxilat



Se adaugă metil amină (16 mL, 11,6 mol/L în apă, 186 mmol) în picătură la o soluție de etil 4,6-dicloropiridin-3-carboxilat (20 g, 92 mmol) în acetonitril (300 mL) la 0°C. Amestecul de reacție este lăsat să se încălzească la temperatura camerei peste 2 ore. La amestecul de reacție se adaugă apă și acetat de etil și stratul apos este extras cu acetat de etil. Extractele organice combinate sunt uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Materialul brut rezultat este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu (0-100% EtOAc/hexani) pentru a da, după concentrația fracțiunilor adecvate, etil 6-cloro-4-(metilamino)piridin-3-carboxilat ca solid alb (10,46 g, 52,14 mmol, randament 57%). MS (m/z): 201 (M+H).

Preparare 64

[6-cloro-4-(metilamino)-3-piridil]metanol

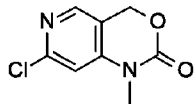


Se adaugă o soluție de etil 6-cloro-4-(metilamino)piridin-3-carboxilat (10,46 g, 52,14 mmol) în THF (100 mL) în picătură la un amestec de hidru de litu aluminu (78,2 mL, 1,0 mol/L în THF, 78,2 mmol) la 0°C. Amestecul de reacție este lăsat să se încălzească la temperatura camerei peste 1,5 ore. La amestecul de reacție se adaugă, secvențial, apă (3 mL), NaOH apos 15% (3 mL), și apoi apă (9 mL). După agitare, amestecul de reacție este filtrat printr-un strat de celite. Filtratul este diluat cu apă și extras cu diclorometan. Extractele organice combinate sunt uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec pentru a da [6-cloro-4-(metilamino)-3-piridil]metanol ca solid galben pal (2,78 g, randament 27%). Turta filtrată de celite este spălată suplimentar cu metanol și filtratul este concentrat la sec. Solidele din turta filtrată sunt colectate și agitate cu diclorometan și filtrate prin celite. Filtratul este combinat cu reziduul din spălările cu metanol și materialul este concentrat la sec și materialul este rezervat. La solidele colectate din filtrare se adaugă cloroform: alcool izopropilic 4:1 și amestecul este agitat peste noapte. Amestecul este filtrat peste un strat de celite, filtratul este combinat cu reziduul rezervat și concentrat la sec

pentru a da o cantitate suplimentară de [6-cloro-4-(metilamino)-3-piridil]metanol ca solid galben pal (5,07 g, randament 56%). Recuperarea totală a [6-cloro-4-(metilamino)-3-piridil]metanolului este 7,85 g, randament 83%). MS (m/z): 173 (M+H).

Preparare 65

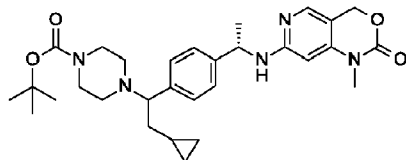
7-cloro-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă



Trifosgenul (6,04 g, 20,4 mol) se adaugă la o soluție de [6-cloro-4-(metilamino)-3-piridil]metanol (5,07 g, 29,1 mol) și DIPEA (51,2 mL, 291 mmol) în THF (100 mL) la -20°C. Baia rece este îndepărtată și amestecul este lăsat să se încălzească la temperatura camerei. După 30 minute, se adaugă apă și amestecul este extras cu diclorometan. Extractele organice combinate sunt uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate, și concentrate la sec. Materialul brut rezultat este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu (0-100% EtOAc/hexani) pentru a da, după concentrația fracțiunilor adecvate, 7-cloro-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă ca un solid oranj (5,13 g, 24,5 mmol, randament 84%). MS (m/z): 199 (M+H).

Preparare 66

terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-metil-2-oxo-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1



La o soluție de terț-butil 4-[1-[4-[(1S)-1-aminoetil]fenil]-2-ciclopropiletil]piperazin-1-carboxilat (1,30 g, 3,48 mmol), 7-cloro-1-metil-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-2-onă (864 mgs, 4,35 mmol), și carbonat de cesiu (2,27 g, 6,96 mmol) în toluen (17,4 mL) sub azot se adaugă dicloro[1,3-bis(2,6-di-3-pentilfenil)imidazol-2-iliden](3-cloropiridil)paladiu(II) (291 mgs, 0,348 mmol) și amestecul este încălzit la 75°C peste noapte. După răcire la temperatura camerei, amestecul este filtrat printr-un dop de gel de siliciu și eluat cu acetat de etil. Filtratul este concentrat sub presiune redusă și reziduul obținut este purificat prin cromatografie pe gel de siliciu (20-100% EtOAc/hexani). Fracțiunile amestecate sunt repurificate prin cromatografie pe gel de siliciu (50-100% metil terț-butil eter/hexani) și fracțiunile combinate pure din ambele coloane sunt concentrate pentru a da terț-butil 4-[2-ciclopropil-1-[4-[(1S)-1-[(1-metil-2-oxo-4H-pirido[4,3-d][1,3]oxazin-7-il)amino]etil]fenil]etil]piperazin-1-carboxilat, diastereomer 1 ca o spumă albă (1,312 g, 2,400 mmol, randament 69%). MS (m/z): 536 (M+).

Cancerul este recunoscut din ce în ce mai mult ca o colecție eterogenă de boli a căror început și progres sunt induse de funcționarea aberantă a uneia sau mai multor gene care reglează repararea ADN-ului, stabilitatea genomului, proliferarea celulară, moartea celulei, adeziunea, angiogeneza, invazia, și metastaza în micromediile celulare și de țesut. Varianta sau funcționarea aberantă a genelor „canceroase” poate rezulta din polimorfismul ADN care apare natural, modificări în numărul copiilor de genom (prin amplificare, deleție, pierderea cromozomului, sau duplicare), modificări în gene și structura cromozomului (prin translocare cromozomială, inversie, sau alt rearanjament care conduce la dereglarea expresiei genei), și mutații punctuale. Neoplasmele canceroase pot fi induse de o funcționare aberantă a genei, și menținute de aceeași funcționare aberantă a genei, sau întreținerea și progresul exacerbat de funcții suplimentare aberante ale genei.

Dincolo de aberațiile cromozomiale genetice menționate mai sus, fiecare cancer poate include de asemenea modificări epigenetice ale genomului incluzând metilarea ADN, imprimarea genomică, și modificarea histonă prin acetilare, metilare, sau fosforilare. O modificare epigenetică poate juca un rol în inducerea și/sau întreținerea malignității.

Au fost compilate cataloage extensive de aberații citogenetice în cancerul uman și sunt menținute și actualizate regulat online (vezi baza de date Mitelman a aberațiilor cromozomiale în cancer pe web situsul Institutului Național al Cancerului din S.U.A. (NCI) Proiectul pentru anatomia genomului canceros (CGAP)). Proiectul Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genom menține o „Cancer Gene Census” detaliată online a tuturor genelor umane care au fost legate cauzal la tumorigeneză precum și baza de date COSMIC (Catalogul de mutații somatice în cancer)

a mutațiilor somatice în cancerul uman. O sursă suplimentară conținând informație abundentă despre modificările citogenetice legate cauzal la diferite cancere este Atlasul geneticii și Citogenetice în oncologie și hematologie.

Diagnosticul malignităților canceroase prin biopsie, imunofenotipare și alte teste sunt cunoscute și utilizate în mod obișnuit. În plus față de rezoluția ridicată a legării cromozomilor și a tehnologiilor imagistice avansate cromozomiale, aberațiile cromozomiale în cazurile suspecte de cancer pot fi determinate prin analiză citogenetică cum ar fi hibridizarea fluorescență in situ (FISH), kariotiparea, kariotiparea spectrală (SKY), FISH multiplex (M-FISH), hibridizarea genomică comparativă (CGH), matrice de polimorfisme de nucleotide singure (SNP Chips) și alte teste de diagnoză și analiză cunoscute și utilizate de către cei calificați în domeniu.

Mutațiile în IDH1 și IDH2 au fost identificate în multiple tipuri de tumori canceroase incluzând, dar fără a se limita la, gliom, glioblastom multiform, astrocitom, oligodendrogliom, paragangliom, sindrom mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), tiroidă, colorectal, leucemie mieloidă acută (AML), Dang și colab., Trends Mol. Med., 2010, 16: 387-397; Ward și colab., Oncogene, 2012, 31(19): 2491-2498; melanom, Shibata și colab., Am. J. Pathol., 2010, 178(3): 1395-1402; prostate, Flaherty și colab., J. Clin. Oncol., 2014, 32 (suppl. 4; Abstract 213); Cairns și colab., Cancer Discovery, 2013, 3: 730-741; chondrosarcoma and cholangiocarcinom, Balss și colab., Acta Neuropathol., 2012, 124: 883-891; Cairns și colab., Cancer Discovery, 2013, 3: 730-741; angioimunoblastic T cell lymphoma (AITL), Cairns și colab. Blood, 2012, 119(8):1901-1903. Mutațiile au fost găsite la, sau lângă reziduuri particulare în situsul activ: G97D, R100, R132H, R132C, R132S, R132V, R132G, V71I, R132L, și G123R pentru IDH1, Dang și colab., Trends Mol. Med., 2010, 16: 387-397; Ward și colab., 2012 and Supplementary Table 2.

S-a arătat că formele mutante de IDH1 și IDH2 au o activitate neomorfică (poartă de funcționare) reducând α -ketoglutaratul până la 2-hidroxioglutarat. Producția endogenă de 2-hidroxioglutarat este enantiospecifică conducând la generarea de D-enantiomeri (denumiți de asemenea (R) enantiomeri). În mod normal, celulele au niveluri scăzute de 2-hidroxioglutarat în timp ce celulele care găzduiesc mutații IDH1 sau IDH2 dovedesc niveluri semnificativ ridicate de 2-hidroxioglutarat. Niveluri semnificativ ridicate de 2-hidroxioglutarat sunt detectate în tumorile care găzduiesc mutațiile și în plasma pacienților cu IDH1 sau IDH2 mutant. Niveluri ridicate de 2-hidroxioglutarat sunt asociate cu un fenotip de hipermetilare conducând la o blocare în diferențierea care conduce la sporirea tumorigenezei.

Activitatea unui inhibitor covalent ireversibil specific este definită prin legarea sa la țintă (IDH1 sau IDH2), definită prin K_i , și rata potențialului maxim al formării legăturii covalente, definit de k_{inact} . Acești doi factori nu sunt entități separate, ci mai degrabă lucrează împreună pentru a produce efectul dorit al formării legăturii covalente. Acest lucru este ilustrat de următoarele 3 puncte.

Mai întâi, faptul că o electrofilă de exemplu, acrilamidă, trebuie să fie corespunzător poziționată față de o nucleofilă, de exemplu cisteină, este o componentă fundamentală a formării legăturii covalente în chimia organică. Există un unghi precis și o distanță la care nucleofilele trebuie abordate electrofil pentru a forma legătura covalentă. Simpla plasare a unui electrofil lângă o nucleofilă nu este suficient pentru formarea legăturii covalente.

În al doilea rând, când o grupare reactivă este încorporată pe un miez care conține radicali de legare la hidrogen pentru a stabili legarea inhibitorului la enzimă de exemplu, un miez de orientare, un specialist calificat trebuie să ia în considerare cum miezul de orientare se leagă la țintă și pozițiile electrofile față de nucleofile în lumina unghiului optim și distanței menționate mai sus. Din nou, simpla plasare a unui electrofil lângă o nucleofilă nu este suficientă pentru formarea legăturii covalente. Modificările în miezul de orientare pot impacta abilitatea unui compus inhibitor de a forma o legătură covalentă.

În al treilea rând, când cele două puncte de mai sus sunt considerate împreună, simpla prezență a unui radical electrofil pe un miez de orientare nu este suficientă să sugereze că o legătură covalentă va fi formată.

Următoarele studii *in vitro* și *in vivo* demonstrează activitatea inhibitoare a proteinei IDH1 și IDH2 mutante și eficacitatea compușilor testați cu Formula I sau la împotriva diferitelor linii celulare canceroase specifice. Aceste teste sunt în general recunoscute de către cei calificați în domeniu ca o indicație a activității terapeutice clinice umane. Se crede că inhibarea proteinelor neomorfe IDH1 sau IDH2 mutante în studiile divulgate va fi eficientă împotriva proteinelor neomorfe IDH1 și IDH2 mutante suplimentare. Testele care evidențiază activitatea inhibitoare a IDH1 sau IDH2 mutante și eficacitatea pot fi efectuate substanțial după cum urmează sau prin teste similare rezultand date similare.

Rezultatele următoarelor teste demonstrează că compușii exemplificați și testați sunt utili ca inhibitori mutați ai IDH1 și IDH2 și pot fi utili în tratarea cancerelor care exprimă IDH1 sau IDH2 mutante.

Teste biochimice pentru enzimele mutante IDH1 și IDH2

5 Enzimele mutante IDH1-R132H, IDH1-R132C, IDH2-R172K și IDH2-R140Q catalizează conversia aKG până la 2HG. 2HG este analizată utilizând extracția în linie a fazei solide și spectrometria de masă. Această analiză este efectuată într-un instrument RapidFire® cuplat la un spectrometru de masă triplu cvadripol 6460 (G6460A Agilent).

10 Proteinele mutante IDH1 (R132H și R132C) și proteinele mutante IDH2 (R140Q și R172K) conținând etichete His N-terminale sunt exprimate în E.coli și purificate utilizând cromatografia de afinitate cu nichel. Testele enzimice sunt efectuate în plăci de polipropilenă cu fundul în formă de V, cu 96 de godeuri, conținând 100 mM tampon Tris-HCl, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 mM NaCl. Pentru IDH1 R132H, α -ketoglutarat, NADPH și MnCl₂ sunt incluse la concentrații finale de 300 μ M, 2,5 μ M și respectiv 300 μ M. Pentru IDH1 R132C, α -ketoglutarat, NADPH și MnCl₂ sunt incluse la concentrații finale de 100 μ M, 10 μ M și respectiv 100 μ M. Pentru IDH2 R172K, α -ketoglutarat, NADPH și MnCl₂ sunt incluse la concentrații finale de 150 μ M, 10 μ M și respectiv 150 μ M. Pentru IDH2 R140Q, α -ketoglutarat, NADPH și MnCl₂ sunt incluse la concentrații finale de 3000 μ M, 10 μ M și respectiv 100 μ M. PH final = 7,0. Compusul de testat dizolvat în stoc DMSO este diluat în amestecul de reacție la o concentrație DMSO finală de 4%. Compușii sunt testați în format de răspuns la doză. Testul este început prin adăugarea enzimei. Enzimele sunt utilizate la următoarele concentrații finale: IDH1 R132H, 2 nM; IDH1 R132C, 0,5 nM; IDH2 R172K, 1,2 nM; IDH2 R140Q, 1,2 nM. După 90 minute reacția este stinsă prin adăugare de ACN (50:50) conținând acid 3-hidroxi-1,5-pentandioic-2,2,3,4,4-d₅ (5d₅-3HG) ca un standard intern pentru analiza prin spectrometrie de masă și cuantificarea produsului de reacție. 2-hidroxiglutaratul (2HG) în mostrele stinse este separat utilizând cromatografie pe coloană cu schimb puternic de anioni (Fenomenex Strata-X-A SecuritateGuard) și analizat prin spectrometrie de masă într-un spectrometru de masă triplu cvadripol 6460 (G6460A Agilent). Semnalul 2HG detectat este transformat într-o concentrație de analit utilizând o curbă de calibrare generată utilizând concentrațiile 2HG cunoscute. Pentru fiecare compus testat, inhibarea procentuală este calculată utilizând o mostră de control DMSO ca inhibare 0% și nici un control cu enzimă ca inhibare 100%. Valorile IC₅₀ sunt obținute din valorile de inhibare procentuală individuale la diferite concentrații de compus utilizând o ecuație cu 4 parametri. Aceste calcule sunt efectuate utilizând programe de analiză a datelor activității de bază (IDBS) sau Screener (Genedata).

35 Rezultatele acestui test demonstrează că compușii exemplificați și testați inhibă activitatea IDH1 mutant împotriva IDH1/R132H și IDH1/R132C și inhibă activitatea IDH2 mutant împotriva IDH2/R140Q și IDH2/R172K.

Următoarele exemple sunt testate esențial cum s-a descris mai sus și prezintă activitatea împotriva IDH1 mutant și IDH2 mutant așa cum se arată în Tabelul 14 de mai jos.

40 Tabelul 14

Exemplu #	IDH1/R132H IC ₅₀ (μ M)	IDH1/R132C IC ₅₀ (μ M)	IDH2/R140Q IC ₅₀ (μ M)	IDH2/R172K IC ₅₀ (μ M)
1	0,00569 $\pm$ 0,000766, n=3	0,00431 $\pm$ 0,000895, n=3	0,113	0,0328
2	0,00627 $\pm$ 0,00127, n=3	0,00371 $\pm$ 0,00126, n=3	0,0369	0,0115
3	0,0111 $\pm$ 0,0035, n=2	0,0156 $\pm$ 0,0075, n=2	0,0648	0,0156
4	0,0137 $\pm$ 0,0030, n=2	0,00869 $\pm$ 0,00280, n=2	0,0811	0,028
5	0,00276	0,00249		
6	0,00491	0,00505		
7	0,00638	<0,00508	0,0743	0,0224
8	<0,00508	<0,00508	0,046	0,017
9	0,00743 $\pm$ 0,00188, n=2	0,0151 $\pm$ 0,0024, n=2		
10	0,0139 $\pm$ 0,0017, n=2	0,0165 $\pm$ 0,0019, n=2		
11	0,00978 $\pm$ 0,00038, n=2	0,0156 $\pm$ 0,0034, n=2	0,0543	0,02
12	0,0294 $\pm$ 0,0331, n=2	0,0390 $\pm$ 0,0629, n=2	0,134	0,0263
13	0,0124 $\pm$ 0,0105, n=2	0,0166 $\pm$ 0,0055, n=2	0,239	0,039
14	0,0190 $\pm$ 0,0224, n=2	0,0186 $\pm$ 0,0176, n=2	0,746	0,162
Medie + deviația standard a mediei.				

Teste biochimice pentru enzimele IDH1 și IDH2 de tip sălbatic

- Enzimele IDH1 și IDH2 catalizează conversia izocitratului la α KG. Proteinele IDH1 de tip sălbatic (Centrul Național pentru Biotehnologia Informației, Acces: NP_001269316,1) și IDH2 (Centrul Național pentru Biotehnologia Informației, Acces: EAX02082,1) conținând etichete His N-terminale sunt exprimate în *E. coli* și purificate utilizând cromatografie de afinitate cu nichel. Testele enzimice sunt efectuate în plăci de polipropilenă cu fundul în formă de V, cu 96 de godeuri, conținând 100 mM tampon Tris-HCl la pH 7,5, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, 120 mM NaCl. Pentru izocitratul de test de tip sălbatic IDH1, NADP⁺ și MnCl₂ sunt incluse la concentrațiile de 85 μ M, 50 μ M și respectiv 20 μ M. Pentru izocitratul de test de tip sălbatic IDH2, NADP⁺ și MnCl₂ sunt incluse la concentrațiile de 30 μ M, 50 μ M și respectiv 10 μ M. Inhibitorii dizolvați în soluție stoc DMSO sunt diluați în amestecul de reacție la o concentrație DMSO finală de 4%. Testul enzimatic este oprit (stins) prin adăugare de ACN (50:50) conținând acid d6-2-ketopentandioic (d6- α KG) ca un standard intern pentru analiza prin spectrometrie de masă. Zece microlitri de amestec de reacție sunt combinați cu 100 μ L de apă, 50 μ L de O-benzilhidroxilamină 1 M în tampon de piridină (8,6% piridină, pH 5), și 50 μ L de clorhidrat de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimidă (EDC) 1 M în tampon de piridină. După derivatizare la temperatura camerei timp de o oră, mostrele sunt extrase cu 600 μ L de EtOAc. Patru sute μ L din stratul superior sunt îndepărtați, uscați sub azot încălzit și reconstituiți cu 100 μ L de MeOH/apă (1:1). Zece μ L de mostră derivatizată sunt injectați pe un sistem LC-MS constând dintr-un sistem Shimadzu Prominence 20A HPLC și un spectrometru de masă triplu cvadripol Thermo Quantum Ultra™. Analizii sunt separați pe o coloană Waters XBridge™ C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 μ m) cu un debit de 0,6 mL/minut. Faza mobilă A este 0,1% acid formic în apă și faza mobilă B este MeOH. Semnalul α KG detectat este transformat în concentrație de analit utilizând o curbă de calibrare generată utilizând concentrațiile α KG cunoscute. Pentru fiecare compus testat, inhibarea procentuală este calculată utilizând o mostră de control DMSO ca inhibare 0% și nici un control cu enzimă ca inhibare 100%. Valorile IC₅₀ sunt obținute din valorile de inhibare procentuală individuală la diferite concentrații de compus utilizând o ecuație cu 4 parametri. Aceste calcule sunt efectuate utilizând programe de analiză de date ale activității de bază (IDBS) sau Screener (Genedata).
- Rezultatele acestui test demonstrează că compușii exemplificați și testați sunt mai puțin activi la inhibarea enzimei de tip sălbatic IDH1 în comparație cu enzimele mutante IDH1 R132H sau R132C și mai puțin activi la inhibarea enzimei de tip sălbatic IDH2 în comparație cu enzimele mutante IDH2 R140Q sau R172K.

- Următoarele Exemple din Tabelul 15 sunt testate esențial cum s-a descris mai sus și sunt mai puțin active la inhibarea enzimelor de tip sălbatic în comparație cu enzimele mutante.
- Tabelul 15

Exemplu #	IC ₅₀ a IDH1 de tip sălbatic (μ M)	IC ₅₀ a IDH2 de tip sălbatic (μ M)
1	0,0854 $\pm$ 0,107, n=2	0,801 $\pm$ 0,745, n=2
2	0,105 $\pm$ 0,113, n=2	0,884 $\pm$ 0,748, n=2
3	0,425	3,37
4	0,302	3,7
6	0,0549	0,493
7	0,233	1,53
8	0,237	1,62
11	0,345	2,08
12	0,277	3,22
13	0,456	7,03
14	0,392	7,4

IDH1 (R132H) Test de diluție al saltului biochimic

- Compușii liofilizați exemplificați sunt reconstituiți până la 10 mM sau 100 mM cu 100% DMSO și ținuri la temperatura camerei până când sunt testați. Proteina IDH1(R132H)-His este exprimată și purificată prin metode bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit de către cei calificați în domeniu. Reactivii testați au inclus următoarele: acid α -ketoglutaric (Sigma Cat# K1875), MnCl₂ - Fisher Scientific Cat# M87-100, NADPH - Sigma-Aldrich Cat# N7505, Tris-HCl (Invitrogen, Cat#15567-027), NaCl (Sigma, S3014), ditiotritol (Sigma, D5545), și TRITON™ X100 (Peirce, 28314). Trusa NAD(P)H-Glo™ de la Promega (G9061).

Tamponul de testare utilizat conține 100 mM Tris-HCl pH 7,0, 120 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,005% TRITON™ X-100, și 2% DMSO (de la adăugarea compusului de testat). IC₅₀ a fiecărui compus este determinat prin incubarea unui compus de răspuns la doză, preparat pe un

Echo555, cu 1,5 nM IDH1(R132H), 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM $MnCl_2$, și 15 μ M NADPH în tampon de testare. Reacția este incubată timp de 2 ore la temperatura camerei, apoi oprită utilizând 6-ciclopropil-5-(izochinolin-5-il)-2-[(3R)-4-(3-metoxipropanoil)-3-metilpiperazin-1-il]piridin-3-carbonitril (10 μ M). Concentrațiile NADPH sunt măsurate utilizând trusa NAD(P)H-Glo™, conform specificațiilor vendorului. Semnalul luminiscent este citit pe Envision (Perkin Elmer; 0,1 sec/oglindă luminiscentă/filtru Lum700 WL400-700). În experimentul diluției de salt ulterior, un echivalent al concentrației compusului până la $10 \times IC_{50}$ este preincubat cu 100 nM IDH1(R132H). Concentrația de compus este întotdeauna mai mare ca, sau egală cu concentrația enzimei. După 2 ore la temperatura camerei, acest amestec este diluat 1:100 într-o soluție conținând α -ketoglutarat (10 mM), $MnCl_2$ (10 mM), și NADPH (15 μ M). Această enzimă finală de reacție conține 1 nM IDH1(R132H) și $0,1 \times [IC_{50}]$. După o incubare de 2 ore la temperatura camerei, concentrația de NADPH este măsurată cum s-a specificat mai sus, utilizând 6-ciclopropil-5-(izochinolin-5-il)-2-[(3R)-4-(3-metoxipropanoil)-3-metilpiperazin-1-il]piridin-3-carbonitril și trusa NAD(P)H-Glo™. Sunt incluse trei controale: 1) „ $10 \times$ Control” conținând $10 \times IC_{50}$ compus în testul de preincubare și enzimă cu excepția a 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM $MnCl_2$, și 15 μ M NADPH, este utilizat în testul final de măsurare a activității enzimei, 2) „Control maxim al activității” conținând DMSO în locul compusului atât pentru testul de preincubare cât și pentru testul de enzimă, și 3) „ $0,1 \times$ Control” conținând DMSO în locul compusului în testul de preincubare și $0,1 \times IC_{50}$ compus în testul de enzimă. O enzimă căreia îi lipsește „controlul minim al activității”, dar altfel echivalentă cu „controlul maxim al activității” este inclusă. Un al doilea set de controale maxime și minime ale activității este efectuat utilizând 1 mM α -ketoglutarat, 1 mM $MnCl_2$, și 15 μ M NADPH. Fiecare afecțiune testată este testată în triplicat și 32 de replicare sunt efectuate pentru controlul maxim al activității (10 mM) și controlul minim al activității (10 mM) în timp ce 16 replicare sunt efectuate pentru controlul maxim al activității (1 mM) și controlul minim al activității (1 mM).

Concentrația de NADP (produs) produsă în fiecare experiment/control este determinată utilizând scăderea procentuală în semnalul observat față de controlul minim al activității, conținând 15 μ M NADPH. Controlul minim al activității (1 mM și 10 mM) și controlul maxim al activității (1 mM și 10 mM) sunt mediate și deviația standard a fost calculată pentru fiecare. Semnalul pentru fiecare diluție de salt și pentru $0,1 \times$ Controale sunt multiplicare cu 15 apoi divizate prin numărul mediu pentru godeurile de control minim al activității (10 mM). Acest număr este scăzut din 15 pentru a calcula NADP (produs μ M). Aceleași calcule sunt utilizate pentru $10 \times$ Controale dar sunt utilizate și controalele minime ale activității (1 mM). μ molii produsului pentru controalele maxime ale activității (1 mM și 10 mM) sunt calculate prin multiplicarea numărului mediu cu 15 apoi împărțind la respectivele controale minime ale activității (1 mM și 10 mM). μ M NADP pentru fiecare godeu este împărțit la media controlului maxim al activității (1 mM sau 10 mM) apoi multiplicat cu 100 pentru a determina activitatea IDH procentuală pentru compusul diluției de salt, $10 \times$ Control, și $0,1 \times$ Control. Un compus care trece trebuie să prezinte <30% activitate pentru $10 \times$ control - arătând că, concentrația de preincubare este suficientă pentru a satura enzima cu compus. În plus, compusul trebuie să prezinte >70-80% activitate pentru $0,1 \times$ control confirmând că nu există inhibare la concentrația compusului $0,1 \times$ diluat.

Compușii exemplificați sunt testați esențial cum s-a descris mai sus și prezintă date de recuperare procentuală pentru IDH1/R132H în acest test. Compușii exemplificați și testați ai prezentei invenții inhibă enzima la 2 ore după diluție contrar compușilor din domeniu care nu inhibă enzima la 2 ore după diluție cu recuperare procentuală. Datele din acest test demonstrează că compușii testați ai prezentei invenții acționează într-o manieră consistentă cu inhibarea covalentă a IDH1 mutant deoarece diluția inhibitorului nu conduce la recuperarea activității enzimei.

Teste pe bază de celule pentru inhibitori mutați ai IDH1

Pentru a testa inhibarea celulară a IDH1 mutant R132C, este utilizată linia celulară fibrosarcom HT1080 (cumpărată de la ATCC). Pentru testarea inhibării pe bază celulară a mutației R132H, linia celulară gliom U87MG (ATCC) a fost transfectată stabil cu o construcție ADN care exprimă enzima mutantă R132H prin metode bine cunoscute și utilizate în mod obișnuit de către cei calificați în domeniu.

Test celular HT1080:

Cincisprezece mii de celule sunt placcate în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu poli-D-lys (15.000 celule/godeu) cu 18-24 ore înainte de tratamentul cu compuși. Patru ore înainte de tratamentul cu compuși, celulele sunt înfometate de glutamină prin îndepărtarea mediului normal și înlocuirea cu mediu fără glutamină. După recoltare, celulele sunt apoi tratate cu diferite concentrații ale compușilor testați (20 μ M până la 1 nM; sau 0,2 μ M până la 0,01 nM) dizolvate în mediu fără glutamină conținând DMSO la o concentrație finală de 0,2%. Incubarea inițială a

- compusului este timp de 1 oră la 37°C/5% CO₂. După 1 oră, se adaugă glutamină la o concentrație finală de 2 mM și celulele tratate sunt apoi incubate pentru încă 18 ore la 37°C/5% CO₂. După 18 ore de incubare, 2HG și αKG intracelulare sunt analizate în lizatele celulare. Lizatele sunt preparate după îndepărtarea mediului și adăugarea tamponului conținând 25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA/1% TRITON™-X 100 la celule. O alicotă a lizatului se adaugă la un amestec de d₆-αKG și d₅-3HG ca standarde interne și amestecul este tratat cu O-benzilhidroxilamină în prezența clorhidratului de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimidă (EDC) și piridinei. Derivații analizați sunt apoi extrași cu EtOAc, uscați, și apoi reconstituiți cu 50% MeOH în H₂O. Mostrele preparate cum s-a descris, au fost injectate în HPLC pentru a separa derivații 2HG și αKG (și corespunzător standardele interne) utilizând o cromatografie cu fază inversă într-o coloană C18. Analiza mostrelor este efectuată utilizând un spectrometru de masă triplu cvadripol 6460 (G6460A Agilent). Semnalele 2HG și αKG detectate sunt transformate în concentrație de analit utilizând raportul de αKG/d₆-αKG și raportul de 2HG/d₅-3HG care sunt extrapolate într-o curbă de calibrare. Inhibarea procentuală pentru fiecare mostră individuală este obținută după normalizarea concentrației 2HG sau αKG calculate la referirile maxime și minime obținute în prezența și în absența glutaminei în timpul tratamentului celulei cu compuși. Valorile IC₅₀ sunt obținute din inhibările procentuale individuale utilizând o ecuație sigmoidală de răspuns la doză cu 4 parametri. Aceste calcule sunt efectuate în mod automat utilizând programe de analiză a datelor activității de bază (IDBS) sau Screener (Genedata).
- Rezultatele acestui test demonstrează că exemplele testate în Tabelul 15 inhibă producția de 2-hidroxiglutarat, care indică inhibarea de IDH1 R132C mutant în celule în acest test. αKG, un metabolit generat de IDH1 de tip sălbatic nu este afectat de inhibitori, care indică că compușii sunt selectivi pentru IDH1 mutant față de IDH1 de tip sălbatic în celule în acest test. Valorile IC₅₀ rezultate pentru următoarele exemple sunt prezentate în Tabelul 16. Pentru acele teste în care curba de inhibare nu a atins 50%, este prezentată cea mai mare concentrație testată (de exemplu IC₅₀ > 20 μM sau > 0,2 μM).

Tabelul 16

Exemplu #	IC ₅₀ a HT1080 (R132C, 2-hidroxiglutarat) (μM)	IC ₅₀ a HT1080 (R132C, αKG) (μM)
1	0,000698 ± 0,000352, n=7	>20,0
2	0,00128 ± 0,00100, n=8	>20,0
3	0,00127 ± 0,00044, n=2	>0,200
4	0,00334 ± 0,00140, n=2	>0,200
5	0,000623 ± 0,000745, n=2	>20,0
6	0,00112 ± 0,00052, n=4	19,2
7	0,000625 ± 0,000182, n=2	>0,200
8	0,000775 ± 0,0000981, n=2	>0,200
9	0,00275 ± 0,00046, n=3	>20,0
10	0,00391 ± 0,00259, n=3	>20,0
11	0,00104 ± 0,00050, n=4	>20,0
12	0,00272 ± 0,00330, n=4	>20,0
13	0,000987 ± 0,000009, n=2	>20,0
14	0,00138 ± 0,00015 n=3	>20,0
Medie + deviație standard of media.		

Test celular U87MG/IDH1R132H

- Celulele sunt placcate în plăci cu 96 de godeuri acoperite cu poli-D-lys (12.000 celule/godeu) cu 18-24 ore anterior tratamentului cu compuși. Patru ore înainte de tratamentul cu compuși, celulele sunt înfometate de glutamină prin îndepărtarea mediului normal și înlocuirea cu mediu fără glutamină. După recoltare, celulele sunt apoi tratate cu diferite concentrații ale compușilor testați (20 μM până la 1 nM) dizolvați în mediu fără glutamină conținând DMSO la o concentrație finală de 0,2%. Incubarea inițială a compusului este timp de 1 oră la 3°C/5% CO₂. După 1 oră, glutamina se adaugă la o concentrație finală de 2 mM și celulele tratate sunt apoi incubate pentru încă 18 ore la 37°C/5% CO₂. 2HG intracelular este analizat în lizatele celulare obținute după îndepărtarea mediului și tratamentul cu tampon de lizare (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA/1% TRITON™-X 100). Lizatele celulare sunt conservate la -80°C până când sunt procesate. Pentru extragerea analitului, o alicotă de lizat dezghețat este transferată la o placă adâncă cu 96 de godeuri și tratată cu MeOH rece conținând d₅-3HG ca un standard intern urmat de cloroform și H₂O (1:4:3:2). Faza superioară este colectată după separare și injectată în HPLC pentru a separa 2HG (și standardul intern) utilizând

cromatografia de interacțiune hidrofilă (HILIC) cuplată la detecția MS/MS într-un spectrometru de masă triplu cvadripol 6460. Inhibarea procentuală pentru fiecare mostră individuală este obținută după normalizarea concentrației 2HG calculată la referirile maxime și minime obținute în prezența și în absența glutaminei în timpul tratamentului celulei cu compuși. Valorile IC₅₀ sunt obținute din inhibarea procentuală individuală utilizând o ecuație sigmoidală de răspuns la doză cu 4 parametri. Aceste calcule sunt efectuate în mod automat utilizând programele de analiză a activității de bază (IDBS) sau Screener (Genedata).

Următoarele exemple sunt testate esențial cum s-a descris mai sus și prezintă activitate de inhibare împotriva IDH1/R132H mutant în celulele U87MG în acest test așa cum se arată în

10 Tabelul 17 de mai jos.

Tabelul 17

Exemplu #	U87MG (IC ₅₀ a IDH1/R132H 2-hidroxiglutarat (μM))
1	0,000209 ± 0,000100, n=6
2	0,000406 ± 0,000375, n=8
3	0,000426 ± 0,000188, n=2
4	0,000805 ± 0,000187, n=2
5	0,000295 ± 0,00200, n=2
6	0,000379 ± 0,000202, n=2
7	0,000356 ± 0,000178, n=2
8	0,000432 ± 0,000016, n=2
9	0,000388 ± 0,000703, n=2
10	0,000529 ± 0,000356, n=2
11	0,000258 ± 0,000209, n=3
12	0,00135 ± 0,00151, n=4
13	0,000267 ± 0,000227, n=2
14	0,000353 ± 0,000483, n=2
Medie ± deviația standard a mediei.	

Test 2-Hidroxiglutarat in vivo

Pentru testarea in vivo a inhibitorilor IDH1, tumorile xenogrefă subcutanate sunt crescute în șoareci nuzi atimici (20-22g, Harlan Laboratories) după implantarea fie a celulelor HT1080 (fibrosarcom care poartă IDH1 mutant R132C) sau fie a celulelor TB08 (glioblastom secundar care poartă IDH1 mutant R132H). Șoarecii sunt alimentați și spălați ad libitum și sunt aclimatizați timp de 1 săptămână înainte de implantarea celulelor. Celulele tumorale (HT1080) sau fragmentele tumorale (TB08) sunt implantate în flancul drept din spate. Pentru HT1080, 5,0 x 10⁶ celulele sunt implantate într-un amestec 1:1 cu Matrigel într-un volum final de 0,2 ml. Pentru TB08, fragmentele tumorale generate din mostrele explantate din tumoare sunt implantate direct în flancul posterior. Volumele tumorale sunt măsurate cu șublerul de două ori săptămânal și volumul tumoral este calculat utilizând $0,536 \cdot L \cdot W^2$, unde L=lungimea și W=lățimea. Când volumele tumorale ating 150-400 mm³, animalele sunt randomizate, plasate în grupuri (n=3-6 pe grup) și dozele cu inhibitori IDH1 sau vehicul cu control. Pentru inhibitorii IDH1, compușii sunt formulați în vehicul conținând fie 1% hidroxietilceluloză/0,25% TweenTM 80/0,05% Antifoam sau 10% Acacia cu 1,1 mol echivalent de HCl. Compușii sunt sonicați în baie pentru a obține o suspensie. Compușii sunt dozați pe o bază de miligram pe kilogram (mpk) prin gavaj oral într-un volum final de 0,2 ml. Pentru a determina inhibarea 2HG, compușii sunt dozați de două ori zilnic (BID) timp de 3 zile (număr total de doze = 6). După tratamentul cu compus, șoarecii sunt eutanasiați cu anestezie cu izofluoran și dislocare cervicală. Tumorile sunt excizate, puse în tuburi etichetate, și imediat congelate în azot lichid. Tumorile sunt depozitate la -80°C pentru procesare.

Prepararea lizatelor tumorale

Tamponul XY Lite este preparat în apă de calitate moleculară și conține următoarele componente: 25 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% TRITONTM X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA. La XY Lite (40 ml), se adaugă 800 μl de cocktail de protează Halt și inhibitori de fosfatază (cocktail de protează HaltTM și inhibitori de fosfatază, Thermo Scientific fără EDTA, Cat# 78441). Mostrele sunt vortexate și apoi răcite pe gheață. Tuburile portocalii astupate de lizare-A sunt etichetate și plasate într-un raft pe gheață. Un mojar ceramic cu pistil este plasat în gheață uscată pentru a se răci. O folie de aluminiu de 2 x 2 inci pătrați este plasată la partea inferioară a mojarului. O mostră din tumoare este transferată la mojarul prăcit pe folia pătrată. Se adaugă azotul lichid (aproximativ 5 ml) și se lasă să se evapore, superînghețând tumoarea. O altă piesă din folie este plasată peste tumoare și tumoarea este zdrobită în piese mici cu pistilul ceramic.

Tumoarea zdrobită este transferată repede la tubul de lizare. Se adaugă XY Lite cu gheață rece (500 µL) la fiecare tub și se acoperă. Tumorile sunt apoi procesate pe FastPrep-24 MP Biomedicals prin rotirea de două ori timp de 35 secunde fiecare la o viteză setată la 5. Mostrele sunt apoi centrifugate în Beckman Microfuge R la 4°C la 14.000 rpm timp de 30 minute.

5 Supernatantul este transferat la o placă adâncă cu 96 de godeuri prerăcită. Peletul este eliminat.

Test proteic

O placă de diluție a testului de proteină este generată mai întâi prin adăugarea tamponului XY (145 µL) la o placă Corning nesterilă cu fund plat cu 96 de godeuri. La aceasta, se adaugă lizat tumoral (5 µL) și se amestecă ușor. Placa este ținută pe gheață. Diluțiile seriale de BSA standard (Thermo Scientific cat. 23209 2 mg/mL) sunt setate după cum urmează: Cinci tuburi de 10 0,5 mL sunt plasate într-un raft și tamponul XY (60 µL) se adaugă la fiecare. Stocul BSA (60 µL) se adaugă la primul tub și se vortexează. 60 µL din primul tub sunt transferați la următorul tub, se vortexează, și tot așa, până când seria de diluție este completă după cum urmează: Tub 1= stoc BSA, Tuburile 2-5 sunt diluții seriale 1:2, Tubul 6= tampon XY singur. Reactivii termo de testare a proteinei BCA sunt amestecați în conformitate cu instrucțiunile fabricantului. Se adaugă reactiv 15 BCA amestecat (200 µL) la fiecare mostră și se incubează timp de 15 minute. Rezultatele testelor de proteină sunt citite pe cititorul de placă SOFTmax Pro. Pe baza rezultatelor testelor de proteină, cantitatea adecvată de tampon XY se adaugă la fiecare lizat tumoral pentru a genera o concentrație finală de proteină de 5 mg/mL. Toate mostrele sunt etichetate și depozitate la -80°C.

20 Analiza metaboliților în lizatele tumorale

Efectele *in vivo* ale inhibării IDH1 asupra concentrațiilor de 2HG și aKG totale sunt determinate prin analiză de spectrometrie de masă cu cromatografie de lichide (LC-MS) a xenogrefelor tumorale. Metoda utilizează derivatizarea cu O-benzilhidroxilamină înainte de analiza prin LC-MS. Zece microlitri din fiecare lizat tumoral sunt plasați într-o placă adâncă cu 96 25 de godeuri și combinați cu 100 µL de soluție standard internă conținând 10 µM d₃-3HG și 10 µM d₆-αKG. 50 µL de 1 M O-benzilhidroxilamină în tampon de piridină (8,6% piridină, pH 5) și 50 µL de 1 M clorhidrat de N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimidă (EDC) în tampon de piridină se adaugă la fiecare mostră. Reacția de derivatizare continuă la temperatura camerei timp de o oră. Utilizând un mânuitor de lichide Beckman Biomek FX, 600 µL de EtOAc se adaugă la 30 fiecare mostră. Plăcile sunt etanșate și vortexate timp de 5 minute, apoi ele sunt centrifugate timp de 5 minute la 4000 rpm într-o centrifugă Eppendorf 5810R. 400 µL din stratul superior sunt transferați la o placă nouă cu 96 de godeuri. Mostrele sunt uscate sub azot încălzit la 50°C și reconstituite cu 100 µL de MeOH/apă (1:1). Un microlitru de mostră derivatizată este injectat pe un sistem LC-MS constând dintr-un sistem Shimadzu Prominence 20A HPLC și un spectrometru 35 de masă triplu cvadruplu Thermo Quantum Ultra™. Analizii sunt separați pe o coloană Water XBridge™ C18 (2,1 x 50 mm, 3,5 µm) cu un debit de 0,6 mL/minut. Faza mobilă A este 0,1% acid formic în apă și faza mobilă B este MeOH. Profilul gradientului este: 0 minute, 5% B; 3 minute, 100% B; 4,00 minute, 100% B; 4,1 minute, 5% B; 5,50 minute, stop. Spectrometrul de masă utilizează o sondă HESI-II operată în mod de monitorizare a reacției selectate de ioni 40 pozitivi. Curbele de calibrare sunt construite prin plotarea concentrațiilor de analit vs. raportul zonelor de analit/maxim intern standard și efectuarea unei ajustări pătratice a datelor utilizând o ponderare 1/concentrație cu software-ul Xcalibur™. Concentrațiile de analit pentru necunoscute sunt calculate înapoi din curbele de calibrare. Datele despre metaboliți din testul LC-MS sunt exprimate în nmol/mg proteină. Nivelul 2HG mediu în grupul tratat cu vehicul este utilizat pentru 45 a determina controlul de inhibare de 0%. Inhibarea procentuală la fiecare animal tratat cu inhibitor este apoi determinată față de controlul cu vehicul. Datele sunt analizate în software-ul JMP pentru a determina inhibarea procentuală medie în fiecare grup de dozare, deviația standard, și eroarea standard.

50 Datele demonstrând inhibarea *in vivo* a 2-hidroxiglutaratului la șoarecii cu xenogrefă mutanți IDH1 prin compuși exemplificați și testați sunt prezentate în Tabelul 18 de mai jos.

Tabelul 18

Model xenogrefă	Tratament sau nr. ex.	Doză	Șoareci (n)	2HG, inhibare % medie	Dev std	Er std medie
TB08 (R132H)	Vehicul	0 mpk	5	0	30,3	13,55
TB08 (R132H)	1	1 mpk	5	21,4	21	9,38
TB08 (R132H)	1	2 mpk	5	16,1	30,3	13,6
TB08 (R132H)	1	4 mpk	5	41,5	26	11,6
TB08 (R132H)	1	8 mpk	5	78,8	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	16 mpk	5	92,1	1,8	0,8
TB08 (R132H)	1	32 mpk	5	95,8	0,7	0,3

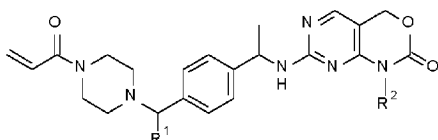
Model xenogrefă	Tratament sau nr. ex.	Doză	Șoareci (n)	2HG, inhibare % medie	Dev std	Er std medie
TB08 (R132H)	Vehicul	0 mpk	5	0	39,2	17,5
TB08 (R132H)	2	1 mpk	5	37,4	13,3	5,9
TB08 (R132H)	2	2 mpk	5	23,9	16,2	7,2
TB08 (R132H)	2	4 mpk	5	63,7	12,1	5,4
TB08 (R132H)	2	8 mpk	5	80,95	6,27	2,8
TB08 (R132H)	2	16 mpk	5	92,97	2,63	1,1
TB08 (R132H)	2	32 mpk	5	96,88	0,68	0,3
Model xenogrefă	Tratament sau nr. ex.	Doză	Șoareci (n)	2HG, inhibare % medie	Dev std	Er std medie
TB08 (R132H)	Vehicul	0,00 mpk	5	0	24,4	10,9
TB08 (R132H)	8	10,0 mpk	5	60,36	10,06	4,5
TB08 (R132H)	7	10,0 mpk	5	69,56	9,15	4,1
TB08 (R132H)	4	10,0 mpk	5	61,82	14,4	6,4
TB08 (R132H)	3	10,0 mpk	5	87,26	3,95	1,77
TB08 (R132H)	14	10,0 mpk	5	86,71	5,27	2,36
Model xenogrefă	Tratament sau nr. ex.	Doză	Șoareci (n)	2HG, inhibare % medie	Dev std	Er std medie
TB08 (R132H)	Vehicul	0,00 mpk	5	0	26,87	12,02
TB08 (R132H)	11	10,0 mpk	5	90,63	4,5	2,01
Model xenogrefă	Tratament sau nr. ex.	Doză	Șoareci (n)	2HG, inhibare % medie	Dev std	Er std medie
TB08 (R132H)	Vehicul	0,00 mpk	5	0	39,6	17,7
TB08 (R132H)	13	10,0 mpk	5	86,3	3,7	1,67
TB08 (R132H)	12	10,0 mpk	5	94,16	0,66	0,3

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2013/046136
- WO-A1-2016/171755
- WO-A1-2017/019429
- WO-A1-2017/213910

(57) Revendicări:

1. Un compus cu formula:



în care:

R¹ este -CH₂CH(CH₃)₂, -CH₂CH₃, -CH₂CH₂OCH₃, sau -CH₂-ciclopropil;

R² este -CH₃ sau -CH₂CH₃; sau

o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

2. Un compus conform revendicării 1 care este:

7-[[[(1S)-1-[4-[(1R)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă];

7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă];

1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 1];

1-etil-7-[[[(1S)-1-[4-[1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)propil]fenil]etil]amino]-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă, izomer 2];

sau o sare acceptabilă farmaceutică a oricăreia din aceștia.

3. Un compus conform revendicării 2 care este 7-[[[(1S)-1-[4-[(1S)-2-ciclopropil-1-(4-prop-2-enoilpiperazin-1-il)etil]fenil]etil]amino]-1-etil-4H-pirimido[4,5-d][1,3]oxazin-2-onă sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

4. O compoziție farmaceutică cuprinzând un compus conform revendicării 1, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, și un purtător acceptabil farmaceutic.

5. Un compus conform revendicării 1, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în terapie.

6. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia, pentru utilizare în tratamentul unui cancer care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant care este gliom, glioblastom, glioblastom multiform, astrocitom, oligodendrogliom, paragangliom, fibrosarcom, limfom al celulei T angioimunoblastic (AITL), sindrom mielodisplazic (MDS), leucemie limfoblastică acută a celulei B (B-ALL), cancer la tiroidă, cancer colorectal, leucemie mieloidă acută (AML), melanom, cancer la prostată, condrosarcom sau colangiocarcinom.

7. Un compus pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 6 în care cancerul care exprimă IDH1 mutant sau IDH2 mutant este fibrosarcom, leucemie mieloidă acută, gliom, sau glioblastom.