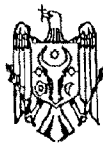




MD/EP 3986561 T2 2024.06.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3986561 (13) T2

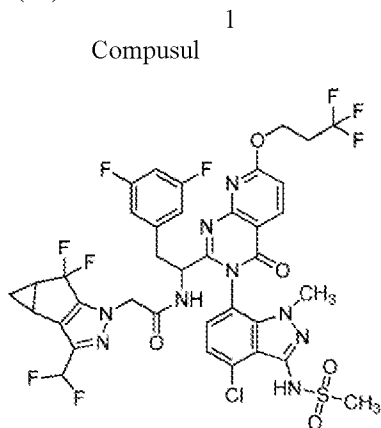
(51) Int. Cl.: A61P 31/18 (2006.01.01)
C07D 471/04 (2006.01.01)
A61K 31/519 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2022 0479	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 06/2024, 2024.06.30
(22) Data de depozit: 2020.06.17	(80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 07/2024, 2024.02.14
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 20743783.1, 2020.06.17	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2022, 2022.05.31
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3986561, 2022.04.27	
(31) Numărul cererii prioritare: 201962863406 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2019.06.19	
(33) Țara cererii prioritare: US	
(71) Solicitant: VIIV HEALTHCARE UK (NO.5) LIMITED, GB	
(72) Inventatori: GILLIS Eric P, US; IWUAGWU Christiana, US	
(73) Titular: VIIV HEALTHCARE UK (NO.5) LIMITED, GB	
(74) Mandatar autorizat: SOCOLOVA Sofia	

(54) Derivați de pirido[2,3-d]pirimidină ca inhibitori ai replicării virusului imunodeficienței umane

(57) Rezumat:



2

și sărurile acceptabile farmaceutic ale acestuia, precum și compozițiile și metodele pentru tratarea infecției cu virusul imunodeficienței umane (HIV) sunt prezentate

Revendicări: 18

Figuri: 1

MD/EP 3986561 T2 2024.06.30

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

DOMENIUL TEHNIC AL INVENȚIEI

5 Invenția se referă la compuși, compoziții, și la compuși pentru utilizare în metode pentru tratamentul infecției cu virusul imunodeficienței umane (HIV). Mai concret, invenția furnizează noi inhibitori ai HIV, compoziții farmaceutice conținând astfel de compuși, și compuși pentru utilizare în metode pentru utilizarea acestor compuși în tratamentul infecției cu HIV. Invenția se referă, de asemenea, la procedee pentru producerea compușilor descriși aici în continuare.

10 STADIUL TEHNICII ÎN DOMENIUL CARE FORMEAZĂ OBIECTUL INVENȚIEI

Sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA) este rezultatul infecției cu HIV. HIV continuă să fie o problemă majoră de sănătate publică. În 2015, se estimează că 36,7 milioane de oameni trăiau cu HIV (inclusiv 1,8 milioane de copii) - o prevalență HIV la nivel global de 0,8%. Marea majoritate din acest număr trăiesc în țări cu venituri scăzute și medii. În același an, 1,1 milioane de oameni au murit din cauza bolilor legate de SIDA.

15 Terapie curentă pentru indivizi infectați cu HIV constă dintr-o combinație de agenți anti-retrovirali aprobați. Aproape patruzeci de medicamente sunt în prezent aprobate pentru infecția cu HIV, fie ca agenți individuali, combinații cu doze fixe sau regimuri cu o singură tabletă; ultimele două conținând 2-4 agenți aprobați. Acești agenți aparțin unui număr de clase diferite, ținând fie enzima virală sau funcția unei proteine virale în cursul ciclului de replicare a virusului. Astfel, agenții sunt clasificați fie ca inhibitori nucleotidici ai revers transcriptazei (NRTI), inhibitori non-nucleotidici ai revers transcriptazei (NNRTI), inhibitori ai proteazei (PI), inhibitori ai transferului lanțului integraziei (INSTI), sau inhibitori de intrare (unul, maraviroc, țintește proteina CCR5 gazdă, în timp ce celălalt, enfuvirtid, este o peptidă care țintește regiunea gp41 a proteinei gp160 virale). În plus, un amplificator farmacocinetic (cobicistat sau ritonavir) se poate utiliza în combinații cu agenți antiretrovirali (ARVs) care necesită stimulare.

În ciuda arsenalului de agenți și combinații de medicamente, rămâne în continuare a nevoie de medicamente pentru noi agenți antiretrovirali. Eterogenitatea virală ridicată, toxicitatea asociată medicamentelor, problemele de tolerabilitate și aderența slabă pot să conducă toate la eșecul tratamentului și pot avea ca rezultat selecția virusurilor cu mutații care conferă rezistența la unul sau mai mulți agenți antiretrovirali sau chiar mai multe medicamente dintr-o clasă întreagă (Beyrer, C., Pozniak A. HIV drug resistance - an emerging threat to epidemic control. *N. Engl. J. Med.* 2017, 377, 1605-1607; Gupta, R. K., Gregson J., și colab. HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2017, 18, 346-355; Zazzi, M., Hu, H., Prosperi, M. The global burden of HIV-1 drug resistance in the past 20 years. *PeerJ.* 2018, DOI 10.7717/peerj.4848). Ca urmare, sunt necesare noi medicamente care să fie ușor de luat, să aibă barieră genetică ridicată la dezvoltarea rezistenței, și să aibă siguranță îmbunătățită față de agenții actuali. În această panoplie de opțiuni, noi mecanisme de acțiune (MOA) care se pot utiliza ca parte a terapiei antiretrovirale preferate (ART) pot avea încă un rol major de jucat, întrucât ar trebui să fie eficienți împotriva virusurilor rezistente la agenții actuali. Îmbunătățirile care ar face medicamentele mai ușor de administrat pentru perioade lungi de timp sau chiar pentru întreaga viață ar putea include toate sau unele dintre următoarele: reacții adverse reduse, interacțiuni medicament-medicament reduse, durată crescută între doze sau căi alternative de administrare care se potrivesc cu preferințele individuale ale pacientului. Obiectivele îmbunătățirii siguranței ar include cu siguranță indici terapeutici înalți față de orice toxicitate care ar determina întreruperea administrării și ar putea include, de asemenea, efecte secundare reduse sau interacțiuni medicament-medicament reduse. Potențialul de a utiliza mai puține medicamente în general într-un regim combinat ar conduce, de asemenea, probabil la îmbunătățirea conformității și a siguranței. Potența crescută împotriva țintei antivirale, în special dacă este menținută în prezența plasmii umane și a albuminei serice, ar conduce, de asemenea, la o doză redusă și ar putea afecta direct și pozitiv durata dozării și indicele terapeutic asupra efectelor secundare și toxicităților. Pentru a rezuma, s-ar obține beneficii maxime pentru pacienții infectați cu HIV dacă ar fi descoperite medicamente anti-HIV cu mecanisme noi de acțiune care să aibă și celelalte beneficii descrise mai sus ce facilitează conformitatea și siguranța pe termen lung.

55 Anumiți compuși potențial terapeutici au fost acum descriși în domeniu și expuși de Blair, Wade S. și colab. în *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (2009), 53(12), 5080-5087, Blair, Wade S. și colab. *PLoS Pathogens* (2010), 6(12), e1001220, Thenin-Houssier, Suzie; Valente, Susana T. *Current HIV Research*, 2016, 14, 270-282, și cereri de brevet PCT cu următoarele numere: WO 2012065062, WO 2013006738, WO 2013006792, WO 20141102901, WO 20141102901, WO 2901, WO 2013006738 8,

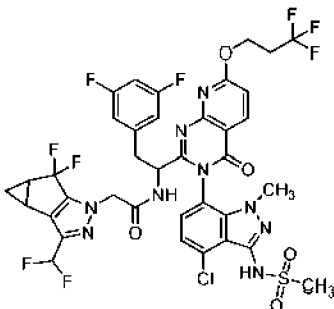
WO 2014134566, WO 2015130964, WO2015130966, WO 2016033243, WO2018035359 și WO2018203235.

Ceea ce este nevoie acum în domeniu sunt compuși suplimentari care să fie noi și utili în tratamentul HIV. În plus, acești compuși ar trebui să ofere avantaje pentru utilizări farmaceutice, de exemplu, în ceea ce privește unul sau mai multe dintre mecanismele lor de acțiune, legarea, eficacitatea

inhibării, selectivitatea țintei, solubilitatea, profilurile de siguranță, biodisponibilitatea și/sau frecvența redusă de dozare. De asemenea, sunt necesare noi formulări și compuși pentru utilizare în metode de tratament care utilizează acești compuși.

REZUMATUL INVENȚIEI

Pe scurt, într-un aspect, prezenta invenție dezvăluie compușii descriși mai jos



și sărurile lor acceptabile farmaceutic (denumiți în continuare „compuși și săruri ale invenției”).

Într-un alt aspect, prezenta invenție dezvăluie o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus sau sare a invenției.

Într-un alt aspect, prezenta invenție dezvăluie un compus sau sare a invenției pentru utilizare în terapie.

Într-un alt aspect, prezenta invenție dezvăluie un compus sau sare a invenției pentru utilizare în tratarea infecției cu HIV la om.

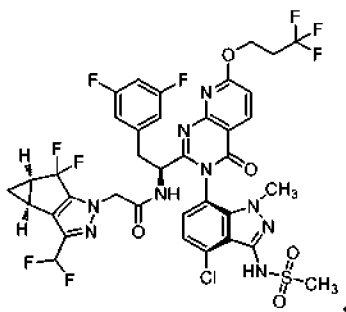
Într-un alt aspect, prezenta invenție dezvăluie utilizarea unui compus sau a unei sări a invenției la fabricarea unui medicament pentru tratamentul infecției cu HIV la om.

DESCRIEREA PE SCURT A FIGURILOR

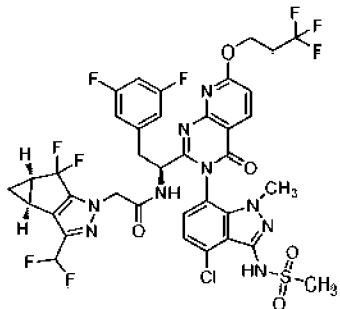
Figura 1 este un rezumat al profilurilor concentrației plasmatice medii-timp la șobolani în studiul descris mai jos.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

De preferință, compușii și sărurile invenției au stereochemia descrisă mai jos



Într-un aspect, compușii și sărurile invenției au stereochemia descrisă mai jos



Sărurile invenției sunt acceptabile farmaceutic. Astfel de săruri pot fi săruri de aditie a acizilor sau săruri de aditie a bazelor. Pentru o revizuire a sărurilor adecvate acceptabile farmaceutic vezi, de exemplu, Berge și colab., J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977.

Sărurile de aditie a acizilor acceptabile farmaceutic reprezentative includ, însă nu se limitează la, 4-acetamido-benzoat, acetat, adipat, alginat, ascorbat, aspartat, benzensulfonat (besilat), benzoat, bisulfat, bitartrat, butirat, edetat de calciu, camforat, camforsulfonat (camsilat), caprat (decanoat), caproat (hexanoat), caprilat (octanoat), cinamat, citrat, ciclamat, digluconat, 2,5-dihidroxibenzoat, disuccinat, dodecilsulfat (estolat), edetat (etilendiaminotetraacetat), estolat (lauril sulfat), etan-1,2-disulfonat (edisilat), etansulfonat (esilat), formiat, fumarat, galactarat (mucac), gentisat (2,5-dihidroxibenzoat), glucoheptonat (gluceptat), gluconat, glucuronat, glutamat, glutarat, glicerofosfat, glicolat, hexilrezorcinat, hipurat, hidrab-amină (*N,N*-di(dehidroabietil)-etilendiamină), bromhidrat, clorhidrat, iodhidrat, hidroxinaftoat, izobutirat, lactat, lactobionat, laurat, malat, maleat, malonat, mandelat, metansulfonat (mesilat), metilsulfat, mucat, naftalen-1,5-disulfonat (napadisilat), naftalen-2-sulfonat (napsilat), nicotinat, nitrat, oleat, palmitat, *p*-aminobenzensulfonat, *p*-aminosalicilat, pamoat (embonat), pantotenat, pectinat, persulfat, fenilacetat, feniletilbarbiturat, fosfat, poligalacturonat, propionat, *p*-toluensulfonat (tosilat), piroglutamat, piruvat, salicilat, sebacat, stearat, subacetat, succinat, sulfamat, sulfat, tanat, tartrat, teoclat (8-cloroteofilinat), tiocianat, trietiliodură, undecanoat, undecilenat, și valerat.

Sărurile de aditie a bazelor acceptabile farmaceutic reprezentative includ, însă nu se limitează la, aluminiu, 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propandiol (TRIS, trometamină), arginină, benetamină (*N*-benzilfenetilamină), benzatină (*N,N'*-dibenziletildiamină), *bis*-(2-hidroxietil)amină, bismut, calciu, cloroprocaină, colină, clemizol (1-*p* clorobenzil-2-pirolidin-1'-ilmetilbenzimidazol), ciclohexilamină, dibenziletildiamină, dietilamină, dietiltriamină, dimetilamină, dimetiletanolamină, dopamină, etanolamină, etilendiamină, L-histidină, fier, izochinolină, lepidină, litiu, lizină, magneziu, meglumină (*N*-metilglucamină), piperazină, piperidină, potasiu, procaină, chinină, chinolină, sodiu, stronțiu, *t*-butilamină, și zinc.

Într-o variantă de realizare, sărurile de aditie a acizilor sunt selectate dintre săruri clorhidrat, bromhidrat, iodhidrat, sulfat, bisulfat, nitrat, fosfat, fosfat acid, acetat, benzoat, succinat, zaharat, fumarat, maleat, lactat, citrat, tartrat, gluconat, camsilat, metansulfonat, etansulfonat, benzensulfonat, *p*-toluensulfonat și pamoat. Într-o variantă de realizare, sărurile de aditie a bazelor includ săruri cu metale (cum ar fi sodiu, potasiu, aluminiu, calciu, magneziu și zinc) și amoniu (cum ar fi sărurile izopropilamină, dietilamină, dietanolamină). Alte săruri (cum ar fi trifluoroacetații și oxalații) se pot utiliza la fabricarea compușilor și sărurilor invenției, și sunt incluse în limitele invenției.

Toate formele stoechiometrice și nestoechiometrice posibile ale sărurilor compusului invenției sunt incluse în limitele invenției. Sărurile de aditie a acizilor și bazelor se pot prepara de către chimistul de specialitate, prin tratarea unui compus al invenției cu un acid adecvat sau cu o bază adecvată într-un solvent adecvat, urmată de cristalizare și filtrare.

Compozițiile farmaceutice ale invenției cuprind în plus un purtător, excipient și/sau diluant acceptabil farmaceutic. Într-o variantă de realizare, compozițiile farmaceutice ale invenției cuprind în plus un excipient acceptabil farmaceutic.

În metoda acestei descrieri, căile preferate de administrare sunt orală și prin injectare pentru a elibera subcutanat sau intramuscular. De aceea, compozițiile farmaceutice preferate includ compozițiile adecvate pentru administrare orală (de exemplu tablete) și compozițiile adecvate pentru injectare, de exemplu injectarea subcutanată sau intramusculară.

Într-un aspect, prezenta invenție dezvăluie un compus pentru utilizare în metode de prevenire a infecției cu HIV la un om sau de reducere a riscului de infecție, cuprinzând administrarea unui compus sau a unei sări ale invenției. Profilaxia de pre-expunere (sau PrEP) este atunci când persoanele care prezintă de infecție cu HIV iau de două ori pe zi medicamentul pentru a-și reduce șansele de a face infecție cu HIV. PrEP s-a dovedit a fi eficientă în reducerea riscului de infectare. Așa cum se utilizează aici, "HIV" sau "Virusul imunodeficienței umane" se referă la HIV-1 și/sau la HIV-2.

Compușii și sărurile invenției se consideră că au ca țintă biologică capsida HIV și astfel mecanismul lor de acțiune este de a modifica în unul sau mai multe moduri funcția capsidei HIV. De exemplu, compușii și sărurile invenției pot să funcționeze ca inhibitori ai capsidei.

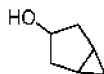
Compușii și sărurile invenției se pot utiliza singuri sau în combinație cu alți agenți terapeutici. Terapiile combinate conform prezentei invenții cuprind astfel administrarea a cel puțin unui compus sau sare a invenției, și administrarea a cel puțin unui alt agent care poate fi util în tratamentul infecției cu HIV. Compușii și sărurile invenției și orice alt agent activ farmaceutic se pot administra împreună sau separat și, atunci când se administrează separat, administrarea poate să apară simultan sau separat, în orice ordine. De exemplu, un compus sau sare a invenției, și celălalt agent se pot formula și administra împreună într-o singură compoziție farmaceutică sau se pot formula și administra separat.

Cantitățile de compus și săruri din prezenta invenție și celălalt(i) agent(i) activ(i) farmaceutic și momentele relative de administrare vor fi selectate pentru a obține efectul terapeutic combinat dorit. Administrarea în combinație a compusului prezentei invenție și a sărurilor, solvaților sau a altor derivați acceptabili farmaceutic ai acestuia cu alți agenți de tratament poate fi în combinație prin administrare concomitentă în: (1) o compoziție farmaceutică unitară inclusiv compuși multipli; sau (2) compoziții farmaceutice separate fiecare incluzând unul dintre compuși. Alternativ, combinația poate fi administrată separat într-o manieră secvențială în care un agent de tratament este administrat primul și celălalt al doilea sau invers, iar diferiții agenți ar putea fi administrați în scheme diferite, dacă este cazul. O astfel de administrare secvențială poate fi apropiată în timp sau îndepărtată în timp. Cantitățile de compus al invenției, sau săruri ale acestuia și alți agent(i) activ(i) farmaceutic și momentele relative de administrare vor fi selectate pentru a obține efectul terapeutic combinat dorit.

Ca atare, compușii și sărurile prezentei invenție pot fi utilizate în combinație cu unul sau mai mulți agenți utili în prevenirea sau tratamentul HIV. Astfel de agenți includ, de exemplu, inhibitori nucleozidici ai transcriptazei inverse HIV, inhibitori non-nucleozidici ai revers transcriptazei HIV, inhibitori HIV ai proteazei, inhibitori ai fuziunii HIV, inhibitori ai atașării HIV, inhibitori CCR5, inhibitori CXCR4, inhibitori ai dezvoltării sau maturării HIV și inhibitori ai integralei HIV. Alți agenți adecvați includ, de exemplu, abacavir, atazanavir, bictegravir, cabotegravir, darunavir, delaviridină, didanozină, dideoxinozină, dolutegravir, doravirină, efavirenz, elvitegravir, emtricitabină, etavirină, fosamprenavir, fostemsavir, GSK354, lavulavir, lovirină, lovirină, lovirină, lovirină, lovirină Maraviroc, Nelfinavir, Nevirapină, Raltegravir, Rilpiverină, Ritonavir, Saquinavir, Slatravir, Stavudină, Tipranavir, Tenofovir, Tenofovir Alafenamidă, Tenofovir Dizoproxil Fumarat, Zalcitabină, Zidovudină, Antibodul N6L 739937 și S-648414. Alți agenți adecvați suplimentari includ Dolutegravir, lamivudină, Fostemsavir, Cabotegravir, maraviroc, rilpiverină, Reyataz, Tenofovir, Afenamidă, EfdA, Doravirină și Preziata. Alți agenți adecvați includ Dolutegravir, lamivudină, Fostemsavir și Cabotegravir. Agenții preferați includ, de exemplu, bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, fostemsavir, islatravir și lamivudină. Agenții preferați în mod special includ, de exemplu, bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, fostemsavir și lamivudină.

EXEMPLU

Prepararea biciclo[3.1.0]hexan-3-olului



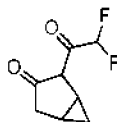
La o soluție agitată de ciclopent-3-enol (130 g, 1545 mmol) în DCM (1200 mL) sub atmosferă de N₂ la 0-5 °C s-a adăugat prin picurare o soluție de dietil zinc în hexan (1,0 M, 3091 ml, 3091 mmoli) pe o perioadă de 3 ore. La soluția la 0°C s-a adăugat prin picurare o soluție de diiodometan (249 ml, 3091 mmoli) în DCM (300 ml) pe o perioadă de 1 oră. Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la 27 °C, după care s-a observat formarea unui precipitat alb. Amestecul a fost agitat timp de 16 ore. Progresul reacției a fost monitorizat prin TLC (SiO₂, 20% EtOAc/pet, R_f = 0,3, UV-inactiv, PMA-activ). Amestecul de reacție a fost stins prin adăugarea atentă de soluție ap. saturată de NH₄Cl (1,5 l). Amestecul a fost filtrat printr-un tampon de Celite. Stratul apos a fost extras cu DCM (2 x 1 l). Straturile organice combinate au fost uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate și apoi concentrate sub presiune redusă pentru a se obține biciclo[3.1.0]hexan-3-ol brut sub formă de lichid roșu, 180 g. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 4,41 - 4,35 (m, 1 H), 2,18 - 2,05 (m, 2H), 1,73 (d, J = 13,9 Hz, 2H), 1,35 - 1,25 (m, 2H), 1. - 1,14 (m, 1 H), 0,57 - 0,43 (m, 2H). GCMS: m/z = 98,1).

Prepararea biciclo[3.1.0]hexan-3-onei

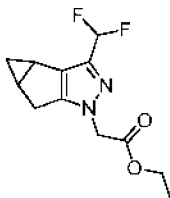


La o soluție agitată de biciclo[3.1.0]hexan-3-ol (210 g, 2054 mmoli) în DCM (5000 ml) sub atmosferă de N₂ la 0 °C s-a adăugat în porțiuni Dess-Martin periodinan (954 g, 225 mmoli). Amestecul a fost lăsat să se încălzească la 27 °C și apoi a fost agitat timp de 16 ore. Progresul reacției a fost monitorizat prin TLC (SiO₂, 20% acetonă/Hex, R_f = 0,3, UV inactiv, PMA-activ). Amestecul de reacție a fost filtrat printr-un strat de Celită și filtratul a fost spălat cu ap. NaOH (1N, 8x 1 l). Fazele apoase combinate au fost extrase cu DCM (5 x 1 l). Straturile organice combinate au fost uscate pe Na₂SO₄ anhidru, filtrate și apoi concentrate sub presiune redusă (temperatura băii: 20 °C) pentru a se obține biciclo[3.1.0]hexan-3-onă brută sub formă de lichid maro. Lichidul a fost purificat în continuare prin distilare descendentă la 70 °C pentru a se obține biciclo[3.1.0]hexan-3-onă sub formă de lichid vâscos galben pal, 125 g (62%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 2,61 - 2,54 (m, 2H), 2,17 - 2,12 (m, 2H), 1,54 - 1,46 (m, 2H), 0,92 - 0,86 (m, 1H), -0,01 - -0,08 (m, 1 H); GCMS: M/Z = 96,1.

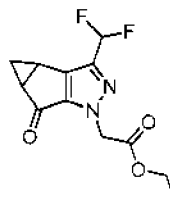
Prepararea 2-(2,2-difluoracetil)biciclo[3.1.0]hexan-3-onei



- La o soluție agitată de biciclo[3.1.0]hexan-3-onă (125 g, 1274 mmoli) în THF (1500 ml) sub atmosferă de N₂ la -78 °C s-a adăugat LDA (2,0 M în THF, 0,701 l, 1402 mmoli). Soluția a fost agitată timp de 1 oră la -78 °C. La soluție s-a adăugat încet, timp de 30 de minute, o soluție de etildifluoracetat (174 g, 1402 mmoli) în THF (300 ml) menținând o temperatură de -78 °C. Amestecul de reacție a fost lăsat să se încălzească la 27 °C și apoi a fost agitat timp de 1 oră. Progresul reacției a fost monitorizat prin TLC (SiO₂, 20% acetonă/hexan, R_f = 0,3, UV-activ). Amestecul de reacție a fost stins prin adăugarea de ap. HCl (1 N, 2000 ml). Amestecul a fost agitat timp de 30 min. și apoi a fost extras cu EtOAc (3 x 1000 ml). Straturile organice combinate au fost spălate cu saramură (1000 ml), uscate pe Na₂SO₄ anhidru și filtrate. Filtratul a fost concentrat sub presiune redusă pentru a obține 2-(2,2-difluoroacetyl)biciclo[3.1.0]hexan-3-onă sub formă de lichid vâscos galben pal, 180 g (71%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,18 (t, J = 54,8 Hz, 1 H), 2,70 - 2,62 (m, 1 H), 2,35 (d, J = 19,4 Hz, 1 H), 2,14 (singlet larg, 1 H), 1,26 - 1,21 (m, 1 H), 1,04 - 1,03 (m, 1 H), 0,22 - 0,21 (m, 1 H), LCMS: M/Z = 173,17).
- 15 Prepararea 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetatului de etil.

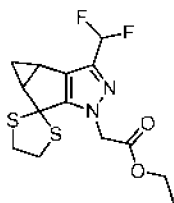


- La o soluție agitată de 2-(2,2-difluoroacetyl)biciclo[3.1.0]hexan-3-onă (180 g, 910 mmoli) în etanol (2 L) sub atmosferă de N₂ la 27 °C s-a adăugat clorhidrat de 2-hidrazinilacetat de etil (422 g, 2729 mmoli) urmat de acid sulfuric (20 ml, 375 mmoli). Amestecul s-a agitat timp de 30 min. și apoi s-a încălzit la 100 °C s-a agitat timp de 16 h. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 20% acetonă/hexan, R_f = 0,3, activ-UV). Amestecul de reacție s-a concentrat la presiune redusă. Reziuduul s-a dizolvat în EtOAc (2000 ml) și s-a spălat cu apă (2 x 1 l), saramură (1,0 l), s-a uscat pe Na₂SO₄ anhidru, s-a filtrat, și apoi s-a concentrat la presiune redusă. Reziuduul rezultat s-a supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (pet.:acetonă 100:0→98:2) pentru a permite obținerea 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetatului de etil as sub forma unui solid alb-murdar, 110 g (46%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 6.86 (t, J= 54.8 Hz, 1H), 4.93 (s, 2H), 4.14 (q, J= 7.2 Hz, 2H), 2.88 - 2.79 (m, 1H), 2.76 - 2.68 (m, 1H), 2.14 - 2.04 (m, 2H), 1.19 (t, J= 7.2 Hz, 3H), 1.10 - 1.03 (m, 1H), 0.14 (q, J= 4.3 Hz, 1H).
- 30 Prepararea 2-(3-(difluorometil)-5-oxo-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetatului de etil.



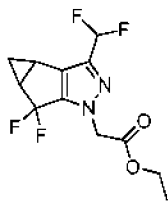
- La o soluție agitată de 2-(3-(difluorometil)-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetat de etil (110 g, 422 mmoli) și celită (395 g) în ciclohexan (3.5 l) la 0 °C s-a adăugat în porții dicromat de piridiniu (794 g, 2110 mmoli). Peste amestecul sub atmosferă de azot s-a adăugat în picătură hidroperoxid de terț-butil (355 ml, 2130 mmoli) într-o perioadă de 10 min. Amestecul de reacție s-a încălzit la 27 °C și apoi s-a agitat la aceea temperatură timp de 48 h. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 30% acetonă/pet, R_f = 0,4, activ-UV). Amestecul de reacție s-a filtrat, și turta de filtrare s-a extras cu EtOAc (1000 ml). Filtratul s-a spălat cu NazS₂O₈ saturat apos (2x500 ml); FeSO₄ saturat apos (300 ml); și apoi saramură (500 ml). Stratul organic s-a uscat pe Na₂SO₄ anhidru, s-a filtrat și s-a concentrat la presiune redusă pentru a obține compusul brut din titlu (150 g).
- 40 Prepararea 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]

pirazol-5,2'-[1,3]ditiolan]-1(3bH)-il)acetatului de etil.



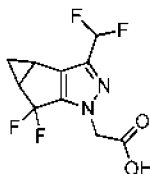
La o soluție agitată de 2-(3-(difluorometil)-5-oxo-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetat de etil (75 g, 269 mmoli) în DCM (1500 ml) la 27 °C sub atmosferă de azot s-a adăugat etan-1,2-ditiol (43,0 ml, 511 mmoli) urmat de adăugarea de bor acid trifluoroacetic (72,6 ml, 511 mmoli). Soluția s-a agitat timp de 16 h. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 20% acetonă/Pet, R_f = 0,35, activ-UV). După terminare, amestecul de reacție s-a răcit la 0 °C și s-a stins prin adăugare de NaHCO₃ apos saturat (500 ml). Amestecul s-a extras cu DCM (2 x 3 1000 ml). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură (1000 ml), s-au uscat pe Na₂SO₄ anhidru, s-au filtrat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a obține un lichid brun. Acest material s-a supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (Pet.:EtOAc 95:5→90:10) pentru a permite obținerea 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-5,2'-[1,3]ditiolane]-1(3bH)-il)acetatului de etil sub forma unui solid alb-murdar, 80 g (74%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,61 (t, J = 55,2 Hz, 1H), 5,00 - 4,85 (m, 2H), 4,29 - 4,19 (m, 2H), 3,55 - 3,46 (m, 4H), 2,63 - 2,53 (m, 1H), 2,49 - 2,38 (m, 1H), 1,30 - 1,24 (m, 4H), 0,65 - 0,60 (m, 1H). LCMS M+H = 346,9.

Prepararea 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetatului de etil



Peste o soluție agitată de 1,3-dibromo-5,5-dimetilimidazolidin-2,4-dionă (26,3 g, 92 mmoli) în DCM (20 ml) la -70 °C sub atmosferă de N₂ s-a adăugat HF-piridină (2,460 g, 24,83 mmoli). Soluția s-a timp de 30 min. Peste soluție s-a adăugat o soluție de 2-(3-(difluorometil)-4,4a-dihidrospiro[ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-5,2'-1,3]ditiolan]-1(3bH)-il)acetat de etil (10 g, 25 mmoli) în DCM (20 ml). Amestecul de reacție s-a lăsat să se încălzească la -40 °C și apoi s-a agitat la aceea temperatură timp de 1 h. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 30% EtOAc/Pet, R_f = 0,3, activ UV-in). Amestecul de reacție s-a stins prin adăugare de apoasă saturată NaHCO₃ (200 ml). Amestecul s-a încălzit la temperatura camerei și s-a extras apoi cu EtOAc (2 x 100 ml). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură (50 ml); s-a uscat pe Na₂SO₄ anhidru; s-au filtrat; și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea unui solid brun. Acest material s-a supus cromatografiei pe coloană cu silicagel (Pet.:EtOAc 100:0→75:25) pentru a permite obținerea 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetatului de etil sub forma unui solid galben deschis, 8,5 g (91%). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ = 6,62 (t, J = 55,2 Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,30 - 4,18 (m, 2H), 2,51 - 2,37 (m, 2H), 1,42 - 1,35 (m, 1H), 1,31 - 1,23 (m, 3H), 1,14 - 1,08 (m, 1H). LCMS M+H = 293,07.

Prepararea acidului 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic



Peste o soluție agitată de 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetat de etil (15 g, 50 mmoli) în THF (17 ml) și MeOH (66 ml) la 0 °C sub atmosferă de N₂ s-a adăugat o soluție de LiOH (1,788 g, 74,7 mmoli) în apă (66 ml). Amestecul de reacție s-a lăsat să se încălzească la 27 °C și s-a agitat apoi timp de 3 h la aceea temperatură. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 5% MeOH/DCM, R_f = 0,2, UV Active). După terminare, amestecul de reacție s-a concentrat la presiune redusă; s-a diluat cu apă (50 ml); și s-a spălat cu

EtOAc (2 x 250 ml) pentru a îndepărta impuritățile. Stratul apos s-a ajustat la pH 2-3 utilizând HCl apos (1M), apoi s-a extras cu EtOAc (3 x 1000 ml). Straturile organice combinate s-au uscat pe Na₂SO₄ anhidru; s-au filtrat; și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea acidului 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic

5

sub forma unui solid alb murdar, 14 g (98%). LCMS M+H = 265,15.
Separarea care permite obținerea acidului 2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic acid and 2-((3bR,4aS)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic

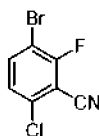


10

Acidul 2-(3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic (5,5 g) s-a dizolvat în izopropanol (20 ml). Soluția s-a supus în porții separării chirale SFC după cum urmează: Instrument = Thar 80; coloană = Chiralpak IC 30x250mm, 5 microni; solvent A = CO₂ super critic; solvent B = izopropanol cu 0,5% izopropilamină (v/v); compoziție eluent = 70%A:30%B; debit = 65 g/min; contrapresiune = 100 bari; temperatură = 30 °C; volum injecție = 2,5 ml; detectare = 220 nm. Acidul 2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic s-a colectat ca un vârf de eluare de la 7,5 min. până la 14 min; acidul 2-((3bR,4aS)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic s-a colectat ca vârf de eluare de la 2,7 min. până la 5,8 min. Pentru fiecare enantiomer, soluția rezultată s-a concentrat la presiune redusă și solidele rezultate s-au dizolvat în EtOAc, apoi s-a spălat de două ori cu citric acid apos (1M) urmat de apă urmată de saramură. Soluția organică s-a uscat pe Na₂SO₄; s-a filtrat; apoi s-a concentrat în vid pentru a permite obținerea enantiomerului separat cu recuperare 80-90%.

15

20

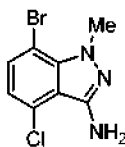


25

Peste o soluție agitată de 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzaldehidă (210,0 g, 0,89 mol, 1,0 equiv.) în apă (2,1 l) at temperatura camerei s-a adăugat hidroxilamină-O-sulfonic acid (175,15 g, 1,55 mol, 1,75 echiv.). Amestecul de reacție s-a încălzit la 50 °C, s-a agitat timp de 18 h). Amestecul s-a răcit la temperatura camerei, s-a agitat timp de 1-1,5 h. Solidele s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu apă. Solidul umed s-a uscat în vid la 50 °C timp de 12-15 h pentru a permite obținerea 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzaldehidei, 190,0 g (91%).

30

Prepararea 7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-aminei



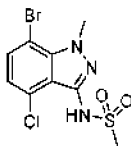
35

Peste o soluție de 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzonitril (360,0 g, 1,55 mol, 1,0 echiv.) în etanol (1,08 l) s-a adăugat sulfat de metilhidrazină (1,11 kg, 7,73 mol, 5,0 echiv.) urmat de adăugarea de trietilamină (1,3 l, 9,3 mol, 6,0 echiv.) la 25-35 °C. Amestecul de reacție s-a încălzit la 110 °C și s-a menținut timp de 15 h (reacția s-a monitorizat prin TLC). După terminarea reacției, amestecul s-a răcit la temperatura camerei. Apă (3,0 l) s-a adăugat și amestecul s-a agitat timp de 1 h la temperatura camerei. Solidele s-au izolat prin filtrare și s-au spălat cu apă. Solidul umed s-a uscat în vid la 50 °C timp de 12-15 ore. Solidul brut s-a purificat prin cromatografie pe coloană (10% EA/hexani până la 40% EA/hexani) pentru a permite obținerea produsului sub forma unui solid galben deschis. Randament: 185,0 g (46,0 %).

40

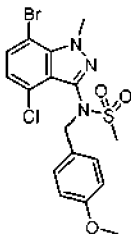
Prepararea N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidei

Prepararea 3-bromo-6-cloro-2-fluorobenzonitrilului



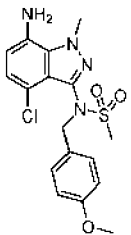
Peste o soluție de 7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-amină (1,40 g, 5,37 mmoli) în DCM (30 ml) s-a adăugat bază Hunig (3,75 ml, 21,5 mmoli) și apoi reacția s-a răcit pe o baie de gheață și s-a adăugat clorură de metansulfonil (1,26 ml, 16,1 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la această temperatură timp de 1h (s-a format un precipitat). Amestecul s-a diluat apoi cu diclorometan (100 ml) și s-a spălat cu apă, 1 M HCl și saramură, s-a uscat (Na₂SO₄), s-a filtrat și s-a concentrat în vid. Reziduul s-a preluat în EtOH (30 ml) și 10 ml de NaOH apos 20%. Amestecul rezultat s-a încălzit până când a devenit o soluție omogenă și s-a agitat la rt timp de 30 min. Amestecul s-a diluat cu apă (80 ml) și s-a acidulat cu HCl 1 N (60 ml). Precipitatul s-a filtrat, s-a spălat cu apă, și s-a uscat în vid pentru a permite obținerea produsului din titlu (1,5 g) sub forma unui solid alb-murdar. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,48 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,24 (singlet larg, 1H), 6,95 (d, J=7,9 Hz, 1H), 4,38 (s, 3H), 3,42 (s, 3H). LC/MS (M+H)⁺ = 337,80.

Prepararea N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metan-sulfonamidei



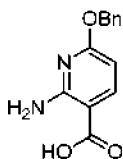
Peste un amestec de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidă (1,3 g, 3,84 mmoli) și 1-(clorometil)-4-metoxibenzen (0,625 ml, 4,61 mmoli) în DMF (30 ml) s-a adăugat carbonat de cesiu (1,626 g, 4,99 mmoli) și amestecul s-a încălzit la 80 °C timp de 2 h. Amestecul s-a turnat în apă (100 ml) și s-a extras cu EtOAc (50 ml, 2x). Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură, s-a uscat pe MgSO₄, s-a filtrat și s-a concentrat în vid. Reziduul s-a purificat cu Bioatag (0~35% EtOAc-hexani) pentru a permite obținerea produsului din titlu (1,5 g) sub forma unei spume albe. ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7,44 (d, J=7,9 Hz, 1H), 7,31 (d, J=8,5 Hz, 2H), 6,99 (d, J=7,9 Hz, 1H), 6,84 (d, J=8,5 Hz, 2H), 4,99 (singlet larg, 1H), 4,76 (singlet larg, 1H), 4,40 (s, 3H), 3,80 (s, 3H), 3,01 (s, 3H).

Prepararea N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metan-sulfonamidăi



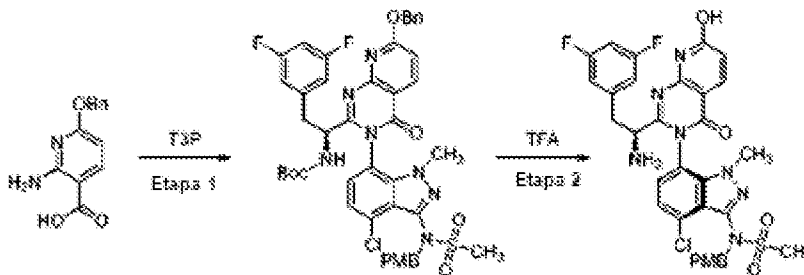
Urmând referința: Andersen, Jacob *etal*, *Synlett* **2005** (14), 2209-2213. Peste un amestec de N-(7-bromo-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metan sulfonamidă (600,0 mg, 1,308 mmoli), iodură de cupru (I) (49,8 mg, 0,262 mmoli), ascorbat de sodiu (518 mg, 2,62 mmoli) și (1R,2R)-N1,N2-dimetilciclohexan-1,2-diamină (46,5 mg, 0,327 mmoli) în NMP (10 ml) s-a adăugat o soluție de azidă de sodiu (255 mg, 3,92 mmoli) în apă (2,0 ml). Amestecul s-a etanșat apoi și s-a încălzit într-un sistem de microunde la 120 °C timp de 2,5 h. Amestecul s-a filtrat apoi printr-un strat de celită și stratul s-a spălat cu EtOAc. Filtratul s-a turnat în apă (100 ml) și s-a extras cu EtOAc (50 ml, 2x). Stratul organic combinat s-a spălat cu saramură, s-a uscat pe MgSO₄, s-a filtrat și s-a evaporat în vid. Reziduul s-a purificat prin Bioatag (5-100% EtOAc/hexani) pentru a permite obținerea produsului din titlu (400 mg) sub forma unui solid alb-murdar. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7,33 - 7,29 (m, 2H), 6,89 (d, J=7,8 Hz, 1H), 6,85 - 6,79 (m, 2H), 6,48 (d, J=7,8 Hz, 1H), 5,11 (br.s, 1H), 4,81 (br.s, 1H), 4,30 (s, 3H), 3,80 (singlet larg, 2H), 3,79 (s, 3H), 2,99 (s, 3H). LC/MS (M+H)⁺ = 395,00.

Prepararea acidului 2-amino-6-(benziloxy)nicotinic



O soluție de acid 2-amino-6-cloronicoticinic (5 g, 29 mmoli) și terțbutoxid de potasiu (9,75 g, 87 mmoli) în alcool benzilic (97 ml) s-a încălzit la 120 °C timp de 3 h. După răcire la temperatura ambiantă, amestecul de reacție de culoare foarte închisă s-a adăugat în apă și s-a spălat cu eter (x3). Stratul apos s-a acidulat apoi cu acid citric 0,5 M. Precipitatul cafeniu s-a filtrat pentru a furniza produsul (4,4 g, 62%) care s-a utilizat în reacția următoare fără altă purificare. ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 12,40 (singlet larg, 1H), 7,94 (d, J=8,55 Hz, 1H), 7,06-7,52 (m, 5H), 6,04 (d, J=8,24 Hz, 1H), 5,33 (s, 2H). LC/MS: m/z = 245,15 [M+1]⁺.

Prepararea N-[(6P)-7-{2-[(1S)-1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-7-hidroxi-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-3-il}-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il]-N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamidei



Etapa 1:

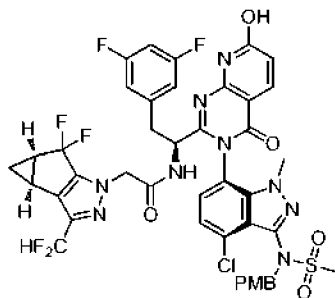
Peste o suspensie de acid (S)-2-((terț-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-difluorofenil)propanoic (5,49 g, 18,23 mmoli) și acid 2-amino-6-(benziloxy)nicoticinic (4,45 g, 18,23 mmoli) în acetonitril (92 ml) (soluție galbenă) la -25 °C s-a adăugat piridină (9,83 ml, 122 mmoli) urmat de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrifosfinan 2,4,6-trioxid ("T3P", 45,2 ml, 76 mmoli). Amestecul de reacție (a devenit o soluție limpede după adăugare de T₃P) s-a agitat la -25 °C până la 10 °C în decurs de 4,5 h, apoi s-a adăugat N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metansulfonamidă (6 g, 15,19 mmoli) și amestecul s-a agitat timp de 18 h cu încălzire la rt. Amestecul de reacție s-a diluat cu acetat de etil, s-a spălat cu NaOH 1N, apoi apă, apoi acid citric 0,5 M, apoi apă, apoi s-a uscat pe Na₂SO₄ și s-a concentrat în vid. Reziduul rezultat s-a purificat pe silice (330 g coloană RediSep Gold) utilizând 0-60 % acetat de etil în hexani peste 15 CV, apoi menținând la 60% EtOAc timp de 10 CV. Frațiile dorite s-au colectat și s-au concentrat pentru a permite obținerea unui solid galben deschis (8,1 g, 9,14 mmoli, randament 60,1 %), un amestec de N-[(1S)-1-[(3P,3P)-7-(benziloxy)-3-(4-cloro-3-{N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamido}-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamate de terț-butil (majoritar) și N-[(1S)-1-[(3M,3M)-7-(benziloxy)-3-(4-cloro-3-{N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamido}-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamate de terț-butil (minoritar). LC/MS: m/z = 886,25 [M+1]⁺.

Etapa 2:

TFA (21,1 ml, 274 mmoli) s-a adăugat peste o soluție de (S)-1-(7-(benziloxy)-3-(4-cloro-3-(4-metoxibenzil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil]carbamate de terț-butil (produs din etapa 1, 8,1 g, 9,14 mmoli) în diclorometan (45,7 ml). Amestecul s-a agitat la rt timp de 2 h. Soluția galben deschis rezultată s-a concentrat. Reziduul s-a preluat în acetat de etil, apoi s-a spălat de trei ori cu NaOH 1 N, apoi s-a uscat pe Na₂SO₄ și apoi s-a concentrat în vid pentru a permite obținerea unui reziduu uleios. Reziduul s-a purificat pe silicagel (330 g coloană RediSep Gold) printr-o metodă cu gradient de Solvent A: Solvent B 65:35→0:100 (2 CV), apoi 0:100 (9 CV); Solvent A = hexani; Solvent B = 9:9:2 hexani:acetat de etil:MeOH. Primul izomer de eluare (majoritar) s-a colectat și s-a concentrat în vid pentru a permite obținerea N-[(6P)-7-{2-[(1S)-1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-7-hidroxi-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-3-il}-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il]-N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamidei (4,1 g, 5,89 mmoli, randament 64,5 %). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-d₆) δ 7,86 - 7,98 (m, 1 H) 7,15 - 7,37 (m, 4 H) 6,97 - 7,06 (m, 1 H) 6,70 - 6,89 (m, 4 H) 6,40 - 6,48 (m, 1 H) 4,70 - 4,88 (m, 2 H) 3,41 - 3,81 (m, 7 H) 3,20 - 3,28 (m, 1 H) 3,08 - 3,12 (m, 3 H) 2,71 - 2,79 (m, 1 H) 1,69 - 2,00 (m, 2 H). LC/MS: m/z = 696,20 [M+1]⁺.

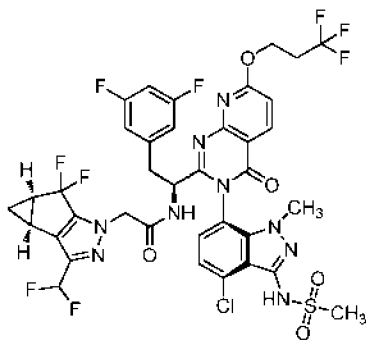
Prepararea N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenzil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((singlet larg, 4aR)-

3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidei



5 Peste o soluție agitată de N-[(6P)-7-{2-[(1S)-1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil]-7-hidroxi-4-oxo-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-3-il]-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il]-N-[(4-metoxifenil)metil]metansulfonamidă (0,926 g, 1,330 mmoli) în DMF (13 ml) s-a adăugat acid 2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic (0,351 g, 1,330 mmoli), hexafluorofosfat(V) de 2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-il)-1,1,3,3-tetrametil-izouroniu ("HATU", 0,531 g, 1,397 mmoli), și DIPEA (0,581 ml, 3,33 mmoli).
10 Amestecul de reacție s-a agitat timp de 2 h după care amestecul de reacție s-a diluat cu apă și s-a extras cu acetat de etil. Extractele de EtOAc combinate s-au spălat cu saramură, s-au uscat pe Na₂SO₄, și s-au concentrat în vid. Produsul brut s-a purificat prin cromatografie flash cu silicagel utilizând 10-100% acetat de etil în hexani pentru a furniza N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamida (1,1 g, 88%) sub forma unui solid spumos alb-murdar.
15 LC/MS: m/z = 942,25 [M+1]⁺.

20 *Prepararea Example 1: N-((S)-1-((3P)-3-(4-Cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă*

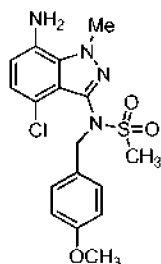


25 O soluție de (E)-diazen-1,2-dicarboxilat de diizopropil ("DIAD", 0,125 ml, 0,637 mmoli) în THF (0,2 ml) s-a adăugat în picătură peste un amestec de N-(1-((3P)-3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-7-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă (0,2 g, 0,212 mmoli)),
30 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (0,073 g, 0,637 mmoli) și trifenilfosfină (0,178 g, 0,679 mmoli) în tetrahidrofuran (2,1 ml) la rt. Amestecul de reacție s-a agitat timp de 18 h la rt și apoi s-a concentrat în vid. Reziuul s-a purificat pe silicagel (24 g coloană RediSep Gold) utilizând un gradient de 0-60 % acetat de etil în hexani peste 15 CV, și apoi menținând la 60 % acetat de etil în hexani timp de 5 CV. Frațiile conținând produsul pur s-au colectat și apoi s-au concentrat pentru a obține un solid galben.
35 Acest solid s-a preluat în DCM (1 ml):TFA (0,5 ml); soluția s-a răcit la 0 °C; și peste soluție s-a adăugat acid triflic (0,057 ml, 0,637 mmoli). Amestecul s-a agitat timp de 1 h și apoi s-a concentrat în vid. Reziuul s-a preluat în acetat de etil; s-a spălat cu NaOH 1 N; s-a spălat cu 0,5M acid citric; s-a uscat pe Na₂SO₄; s-a filtrat; și apoi s-a concentrat în vid. Reziuul s-a supus cromatografiei cu silicagel (24 g coloană RediSep Gold) utilizând 0-60 % acetat de etil în hexani peste 20 CV, apoi la 60 % acetat de etil
40 timp de 10 CV. Frațiile conținând produsul pur s-au colectat și apoi s-au concentrat în vid pentru a obține

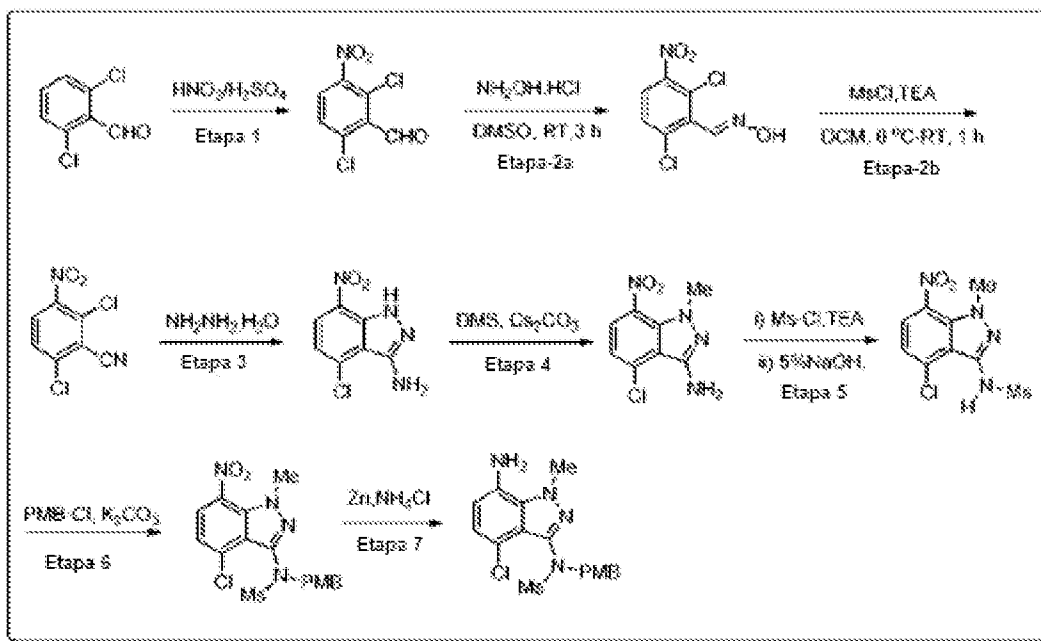
N-(1-((6P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido

[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă (0,078 g, 0,081 mmoli, randament 38,0 %) sub forma unui solid brun. ¹H RMN (500 MHz, METANOL-d₄) δ ppm 8,46 - 8,53 (m, 1 H) 7,28 - 7,34 (m, 1 H) 7,19 - 7,24 (m, 1 H) 7,03 - 7,09 (m, 1 H) 6,53 - 6,81 (m, 4 H) 4,80 (dd, J=5,96, 2,98 Hz, 3 H) 4,49 - 4,62 (m, 2 H) 3,58 - 3,62 (m, 3 H) 3,40 - 3,49 (m, 1 H) 3,22 - 3,24 (m, 3 H) 3,06 - 3,14 (m, 1 H) 2,80 - 2,89 (m, 2 H) 2,37 - 2,44 (m, 2 H) 1,32 - 1,37 (m, 1 H) 0,96 - 1,01 (m, 1 H). Metoda de analiză LCMS: Coloană = Acquity UPLC BEH C18, 2,1 x 100 mm, particule 1,7 μm; Volum de injectare = 5,00 ml; Debit = 0,80 ml/min; Solvent A = 95:5 Apă:MeCN w/ acid formic 0,1% v/v; Solvent B = 5:95 Apă:MeCN w/ acid formic 0,1% v/v; Profil de eluare = Start %B: 0, Sfârșit %B: 100, Timp gradient: 3,5 min. apoi menținere la 100% B timp de 1 min.; Lungime de undă detecție 1 = 220 nm, lungime de undă 2 = 254 nm. Timp de retenție LCMS = 3,097 min; m/z = 918,05 [M+1]⁺.

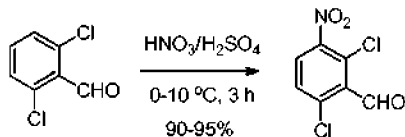
Prepararea alternativă a N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metansulfonamidei



Schema de sinteză:



Etapa 1: Prepararea 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehydei



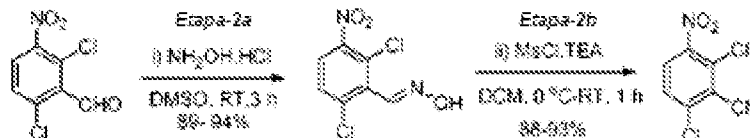
20

Peste o soluție de acid sulfuric (H₂SO₄) (5,63 L, 4,5 V) într-un balon cu fund rotund la 0-5 °C s-a adăugat 2,6-diclorobenzaldehidă (1,25 kg, 7,10 mol, 1,0 echiv.) în porții la temp. sub 15 °C. Masa de reacție s-a agitat la 0-5 °C timp de 30 min. O soluție de amestec de nitrare propăspăt preparat [Preparat din H₂SO₄ conc. (0,425 l, 0,34 V) și HNO₃ 70% (0,85 kg, 13,49 mol, 1,30 echiv.) la 0 °C] s-a adăugat peste amestecul de reacție de mai sus la temp. sub 10 °C [Notă: Reacția este ușor exotermă (3-6 °C); astfel încât se preferă adăugarea la temperatură mai joasă]. Amestecul de reacție s-a agitat la 5-10 °C timp

25

de 2-3 h. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), acesta s-a stins cu apă răcită cu gheață (18,75 l, 15 V) la temp. sub 25 °C. Apoi masa de reacție s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei s-a agitat timp de 2 h. Solidele s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu apă (2,5 l, 2,0 V). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Solidul umed brut s-a uscat inițial sub atmosferă de aer; apoi într-un cuptor cu aer fierbinte la 50-55 °C timp de 10-12 h (până când conținutul de umiditate nu este mai mare de 5,0 %) pentru a obține produsul din titlu uscat, 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehydă (1,44 kg, randament 92%) sub forma unui solid galben. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 10,44 (s, 1H), 7,88 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,56 (d, J= 8,8 Hz, 1H).

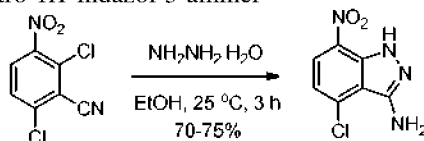
Etapa 2: Prepararea 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitrilului



(Etapa-2a) Peste o soluție de DMSO (5,9 l, 5,0 V) într-un balon cu fund rotund s-a adăugat 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehydă (1,17 kg, 5,31 mol, 1,0 echiv.) la temperatura camerei. După agitare timp de 30 min la temperatura camerei, s-a adăugat clorhidrat de hidroxilamină (0,63 kg, 9,04 mol, 1,70 echiv.) și masa de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 3 h. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), masa de reacție s-a stins prin adăugarea de apă răcită cu gheață (18,0 l, 15,0 V) adăugată cu o viteză suficientă pentru a menține temperatura sub 30 °C (Observație: Solidele s-au format la adăugarea apei). Masa de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 60-90 min. Solidele s-au izolat prin filtrare; s-au spălat cu apă (2,5 l, 2,0 V); urmat de spălare cu un amestec de acetonă și hexani (6,0 l, 1:1 ratio). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Solidul umed s-a uscat inițial în aer și apoi în final s-a uscat într-un cuptor cu aer fierbinte la 50-55 °C timp de 10-12 h (până când conținutul de umiditate nu a fost mai mare de 1,0 %) pentru a obține produsul țintă uscat, oxima 2,6-dicloro-3-nitrobenzaldehydei (1,22 kg, randament 92%), sub forma unui solid alb-murdar. Produsul brut (care conține 10-20% 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitril) s-a utilizat direct în etapa următoare fără altă purificare.

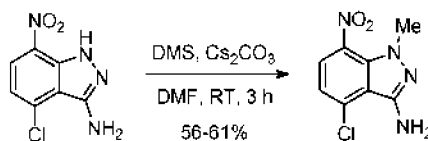
(Etapa-2b) Peste o soluție agitată de oximă brută (prepararea descrisă mai sus, 1,13 kg, 4,80 moli, 1,0 echiv.) în DCM (9,04 l, 8,0 V) la 0-5 °C s-a adăugat trietilamină ("TEA", 1,02 kg, 10,09 moli, 2,1 echiv.). După agitare timp de 5 min, s-a adăugat clorură de metansulfonil (0,60 kg, 5,29 moli, 1,1 echiv.) (Observație: Se observă o reacție exotermă în timpul adăugării) lent la 15 °C. Apoi, masa de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 30-45 min. După terminarea reacției (progresul reacției s-a monitorizat prin TLC; fază mobilă: 20% acetat de etil în hexani), masa de reacție s-a diluat cu apă (6,78 l, 6,0 V); stratul organic s-a separat; și stratul apos s-a extras cu DCM (3,4 l, 3,0 V). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură (5,65 l, 5,0 V); s-au uscat pe Na₂SO₄; și s-au concentrat sub vid. Solidele brute rezultate s-au triturat cu hexani (4,50 l, 4,0 V) la temperatura camerei. Materialul umed s-a uscat într-un cuptor cu aer fierbinte la 50-55 °C timp de 5-6 h pentru a obține produsul uscat, 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitril (0,95 kg, randament 91%) sub forma unui solid galben. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,07 (d, J= 8,8 Hz, 1H), 7,63 (d, J= 8,8 Hz, 1H).

Etapa 3: Prepararea 4-cloro-7-nitro-1H-indazol-3-aminei



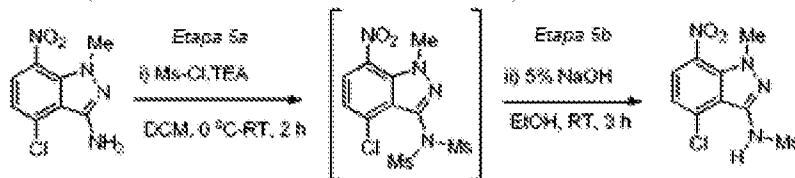
Peste o soluție agitată de 2,6-dicloro-3-nitrobenzonitril (750,0 g, 3,45 moli, 1,0 echiv.) în etanol (7,5 l, 10,0 V) at 15-20 °C. s-a adăugat lent hidrat de hidrazină (519,0 g, 10,36 moli, 3,0 echiv.) cu menținerea masei de reacție sub 25 °C (Observație: adăugarea este ușor exotermă și formarea solidului va începe la adăugare). Temperatura amestecului de reacție s-a ridicat lent la temperatura camerei și apoi amestecul s-a agitat timp de 3 h (Observație: cantitatea de solide va crește în acest timp). După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), amestecul s-a diluat cu apă (7,5 l, 10,0 V) și s-a agitat în continuare timp de 1 h la temperatura camerei. Solidele s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu apă (2,25 l, 3,0 V). Solidul umed s-a spălat cu un amestec 1:1 de acetonă (1,875 l, 2,5 V) și hexani (1,875 l, 2,5 V). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Solidul umed s-a uscat în final într-un cuptor cu aer fierbinte timp de 7-8 h la 50 °C (până când conținutul de umiditate ajunge sub 1,5%) pentru a obține produsul uscat, 4-cloro-7-nitro-1H-indazol-3-amină (549,0 g, randament 75%) sub forma unui solid de culoare roșu-cărmăzuiu. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 10,36 (singlet larg, 1H), 8,20 (d, J= 8,4 Hz, 1H), 7,07 (d, J= 8,40 Hz, 1H), 4,73 (singlet larg, 2H).

Etapa 4: Prepararea 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-aminei



Peste o soluție agitată de 4-cloro-7-nitro-1*H*-indazol-3-amină (500 g, 0,42 moli, 1,0 echiv.) în DMF (5,0 l, 10,0 V) la 5-10 °C s-a adăugat lent carbonat de cesiu (Cs₂CO₃) (1,91 kg, 5,88 moli, 2,5 echiv.) cu menținerea masei de reacție sub 10 °C. După agitare timp de 5-10 min, s-a adăugat dimetil sulfat (326,3 g, 2,59 moli, 1,1 echiv.) cu menținerea masei de reacție sub 10 °C (Notă: Se preferă adăugarea lentă pentru obținerea mai favorabilă a regio-selectivității). Apoi, reacția temperatură s-a ridicat lent la temperatura camerei și agitarea s-a continuat încă 2 h la aceeași temperatură. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), masa de reacție s-a stins prin adăugare de apă răcită cu gheață (15,0 l, 30,0 V) și amestecul rezultat s-a agitat apoi timp de 6-8 h la temperatura camerei. Solidele s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu apă (1,5 l, 3,0 V). Solidul umed s-a spălat cu IPA (1,5 l, 3,0 V) urmat de hexani (1,0 l, 2,0 V). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Solidul umed s-a uscat într-un cuptor cu aer fierbinte timp de 7-8 h at 50 °C (până când conținutul de umiditate este sub 1,0%). Materialul izolat, 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-amina (319,0 g, randament 60%), s-a utilizat în etapa următoare fără altă purificare. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,97 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H), 6,97 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 4,63 (singlet larg, 2H), 3,96 (s, 3H).

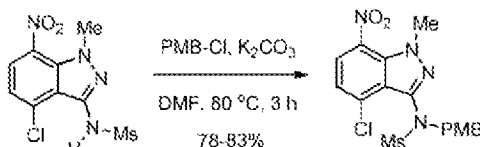
Etapa 5: Prepararea *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamidei



(Etapa 5a) Peste o soluție de 4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-amină (625,0 g, 2,76 moli, 1,0 echiv.) în DCM (6,25 l, 10,0 V) la 0-5 °C. s-a adăugat trietilamină (TEA) (837,0 g, 8,27 moli, 3,0 echiv.); urmat de adăugarea de 4-dimetilaminopiridină (DMAP) (20,60 g, 0,165 moli, 0,06 echiv.). Masa de reacție s-a agitat timp de 5-10 min., apoi s-a adăugat lent clorură de metansulfonil (MsCl) (790,0 g, 6,89 moli, 2,5 echiv.) cu menținerea masei de reacție sub 10 °C. Amestecul de reacție s-a lăsat să se încălzească la temperatura camerei și s-a agitat apoi timp de 1,5-2,0 h. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), amestecul s-a diluat cu apă (6,25 l, 10,0 V) și apoi s-a agitat la temperatura camerei timp de 15 min. Stratul organic s-a separat, și stratul apos s-a extras cu DCM (6,25 l, 10,0 V). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură (1,25 l, 2,0 V), s-au uscat pe Na₂SO₄ și s-au concentrat pentru a obține solidele brute. Solidele s-au triturat cu hexani (1,25 l, 2,0 V) la temperatura camerei pentru a obține intermediarul, *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(metilsulfonil)metansulfonamidă, care s-a utilizat direct în etapa următoare.

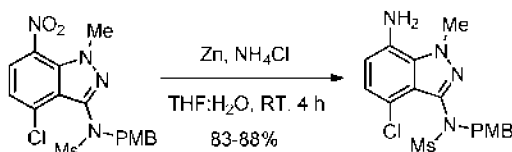
(ii) Peste o soluție agitată de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(metilsulfonil)metansulfonamidă (preparată mai sus) în etanol (10,5 l, 20,0 V) la temperatura camerei s-a adăugat lent pe soluție apoasă 5% de NaOH. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC) [Prepararea probei pentru analiza TLC: ~1,0 ml de probă s-a acidulat cu HCl apos 2,0 N pentru a ajunge la pH: 2-3, s-a extras cu acetat de etil și s-a analizat stratul organic prin TLC], masa de reacție s-a răcit la 0-5 °C și pH-ul s-a ajustat la 2-3 prin adăugare de HCl apos 2,0 N (3,13 l, 5,0 V) menținând temperatura de reacție sub 10 °C [Notă: precipitarea a apărut la adăugare de HCl și s-a intensificat la agitare]. Amestecul de reacție s-a încălzit la temperatura camerei și apoi s-a agitat timp de 1,5-2,0 h. Solidele obținute s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu apă (1,25 l, 2,0 V); urmat de spălare cu hexani (1,25 l, 2,0 V). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Materialul umed s-a uscat într-un cuptor cu aer fierbinte la 50 °C timp de 6-7 h (Până când conținutul de umiditate este sub 1,0%) pentru a obține produsul uscat, *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamidă (640,0 g, 76%) sub forma unui solid galben. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 8,05 (d, *J* = 8,32 Hz, 1H), 7,32 (singlet larg, 1H), 7,17 (d, *J* = 8,28 Hz, 1H), 4,15 (s, 3H), 3,45 (s, 3H).

Etapa 6: Prepararea *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibenzil)metansulfonamidei



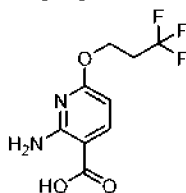
5 Peste un amestec de *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)metansulfonamidă (635,0 g, 2,08 moli, 1,0 echiv.) și 1-(clorometil)-4-metoxibenzen (359,0 g, 2,30 moli, 1,1 echiv.) în DMF (6,35 l, 10,0 V) la temperatura camerei s-a adăugat carbonat de potasiu (374,7 g, 2,70 moli, 1,3 echiv.). Amestecul de reacție s-a încălzit la 80-90 °C și s-a menținut la acea temperatură timp de 3 h. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC), amestecul s-a turnat în apă răcită cu gheață (19,05 l, 30,0 V) [Notă: Se preferă stingerea lentă cu agitare viguroasă pentru a evita aglomerarea pe măsură ce precipită produsul]. Solidele rezultate s-au izolat prin filtrare și s-au spălat cu apă (1,90 l, 3,0 V); apoi solidele s-au spălat cu hexani (1,27 l, 2,0 V). Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 60-90 min. Solidul izolat s-a dizolvat în acetat de etil (12,7 l, 20,0 V) și s-a adăugat cărbune (63,5 g). Amestecul s-a încălzit la 60-70 °C și apoi s-a agitat timp de 30-45 min. la acea temperatură. Amestecul s-a filtrat încă fierbinte (40-50 °C) printr-un pat de celită și patul de celită s-a extras apoi cu acetat de etil (3,17 l, 5,0 V). Filtratele combinate s-au concentrat la sec la presiune redusă la temp. sub 50 °C. S-a adăugat acetat de etil (0,635 l, 1,0 V) peste solide la temperatura camerei. Suspensia solidă rezultată s-a agitat timp de 30 min. Solidele s-au izolat prin filtrare și apoi s-au spălat cu hexani (1,27 l, 2,0 V). Apa reziduală s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 45-60 min. pentru a permite obținerea produsului *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibenzil) metan sulfonamidă (705,0 g, randament 80%) sub forma unui solid galben. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,99 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 7,27 (d, *J* = 8,68 Hz, 2H), 7,19 (d, *J* = 8,24 Hz, 1H), 6,80 (d, *J* = 8,44 Hz, 2H), 4,95-4,76 (m, 2H), 4,17 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,01 (s, 3H).

20 Etapa 7: Prepararea *N*-(7-Amino-4-cloro-1-metil-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibenzil) metansulfonamidei

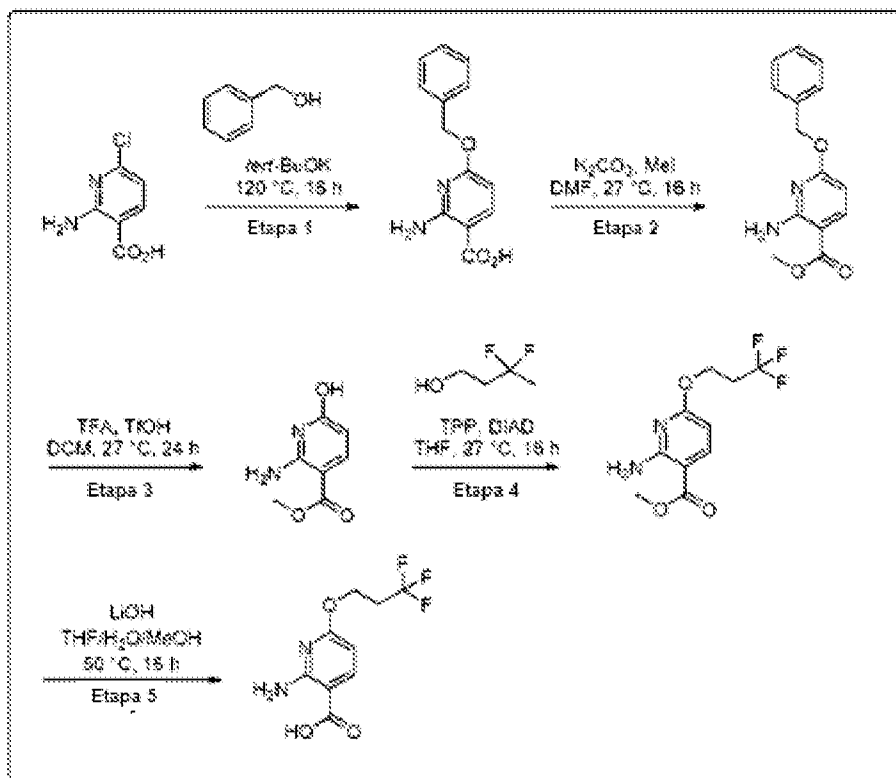


25 Peste o suspensie agitată de pulbere de zinc (540,0 g, 8,23 moli, 10,0 echiv.) într-un amestec de THF (3,50 l, 10,0 V) și apă (7,0 l, 20,0 V) la temperatura camerei s-a adăugat clorură de amoniu (NH₄Cl) (449,0 g, 8,23 moli, 10,0 echiv.). Peste amestec s-a adăugat *N*-(4-cloro-1-metil-7-nitro-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibenzil)metansulfonamidă (350 g, 0,823 moli, 1,0 echiv.) în THF (7,0 l, 20,0 V). Amestecul de reacție s-a agitat la temperatura camerei timp de 3-4 h. După terminarea reacției (monitorizată prin TLC/HPLC în procedeu), amestecul s-a diluat cu acetat de etil (3,5 l, 10,0 V) și apă (1,12 l, 2,5 V). Amestecul s-a agitat timp de 15 min. Masa de reacție s-a filtrat printr-un pat de celită, s-a spălat patul cu acetat de etil (1,75 l, 5,0 V). Filtratul difazic s-a colectat, și fazele s-au separat. Stratul apos s-a extras cu acetat de etil (3,50 l, 10,0 V). Straturile organice combinate s-au spălat cu saramură (3,50 l, 10 V), s-au uscat pe Na₂SO₄, și apoi s-au concentrat în vid pentru a permite obținerea unui solid brut. Peste produsul brut s-a adăugat MTBE (3,25 l, 10 V) și suspensia s-a agitat timp de 30 min la temperatura camerei. Solidele s-au izolat prin filtrare. Apa reziduală în vrac s-a îndepărtat de solide prin menținerea filtrării în vid timp de 30-45 min. Produsul umed s-a uscat într-un cuptor cu aer fierbinte (50 °C) timp de 2 h pentru a permite obținerea produsului din titlu, *N*-(7-amino-4-cloro-1-metil-1*H*-indazol-3-il)-*N*-(4-metoxibenzil)metansulfonamidă (276,0 g, randament 85%) sub forma unui solid alb-murdar. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7,29-7,26 (m, 2H), 6,86-6,79 (m, 2H), 6,42 (d, *J* = 7,80 Hz, 1H), 4,99-4,70 (m, 2H), 4,25 (s, 3H), 3,77 (s, 5H), 2,98 (s, 3H).

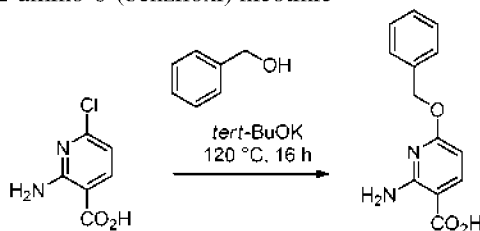
40 Prepararea acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic



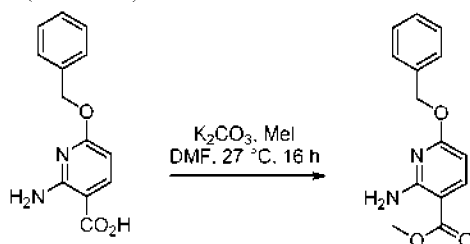
Schema de sinteză:



Etapa 1: Prepararea acidului 2-amino-6-(benziloxi) nicotinic



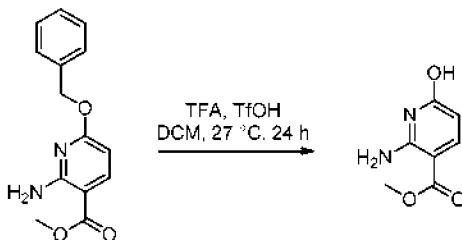
- 5 Peste o soluție agitată de acid 2-amino-6-cloronicotinic (200 g, 1159 mmoli) în alcool benzilic (1400 ml, 13464 mmoli) at 26 °C sub atmosferă de N₂ s-a adăugat terțbutoxid de potasiu (390 g, 3477 mmoli). Amestecul de reacție s-a încălzit la 120 °C s-a agitat timp de 16 hr la aceea temperatură. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 10% MeOH în DCM, R_f = 0,5). La terminare, amestecul de reacție s-a diluat cu apă (3 l) și s-a extras cu eter dietilic (2 x 1000 ml). Stratul organic s-a separat și
- 10 stratul apos s-a acidulat până la pH 4 utilizând soluție apoasă de acid citric (0,5 M). Precipitatul solid s-a colectat prin filtrare și apoi s-a uscat la presiune redusă pentru a permite obținerea acidului 2-amino-6-(benziloxi) nicotinic sub forma unui solid alb-murdar (220 g, randament = 72%). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 12,56 - 12,32 (m, 1H), 7,97 - 7,91 (m, 1H), 7,52 - 7,41 (m, 2H), 7,38 - 7,11 (m, 5H), 6,03 (d, J = 8,5 Hz, 1H), 5,39 - 5,31 (m, 2H). LCMS Purity = 93%; m/z = 245,29 (M+H).
- 15 Etapa 2: Prepararea 2-amino-6-(benziloxi)nicotinatului de metil



- 20 Peste o soluție agitată de acid 2-amino-6-(benziloxi)nicotinic (220 g, 901 mmoli) în DMF (2,5 l) la 26 °C sub atmosferă de N₂ s-au adăugat lent carbonat de potasiu (373 g, 2702 mmoli) și iodometan (0,282 l, 4504 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 27 °C timp de 16 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 40% EtOAc/Pet., R_f = 0,6). La terminare, amestecul de reacție s-a diluat cu apă (5 l). Precipitatul solid s-a izolat prin filtrare și apoi s-a uscat sub vid pentru a permite obținerea 2-

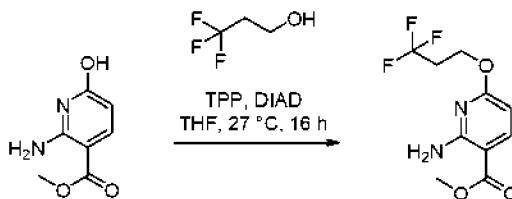
amino-6-(benziloxi)nicotinatului de metil sub forma unui solid alb-murdar (220 g, randament= 92 %). ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ = 8,00 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,42-7,40 (m, 2H), 7,39-7,35 (m, 2H), 7,34-7,31 (m, 1H), 6,01 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 5,33 (s, 2H), 3,84 (s, 3H). LCMS Purity = 97%, m/z = 259,30 (M+H).

Etapa 3: Prepararea 2-amino-6-hidroxinicotinatului de metil



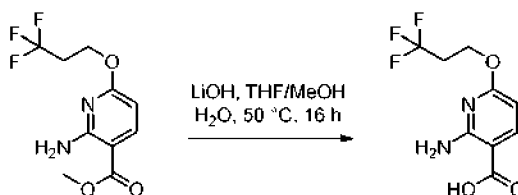
5 Peste o soluție agitată de 2-amino-6-(benziloxi)nicotinat de metil (50 g, 190 mmoli) în DCM (500 ml) la 26 °C sub atmosferă de N_2 s-au adăugat lent TFA (800 ml) și acid triflic (25 ml, 282 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 26 °C timp de 16 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO_2 , EtOAc, Rf = 0,2). La terminare, substanțele volatile s-au îndepărtat sub vid pentru a permite obținerea produsului brut. Acest material s-a triturat cu eter dietilic (3 x 1000 ml) și precipitatul solid s-a izolat apoi prin filtrare. Peste solid s-a adăugat apă (2 l) și amestecul s-a agitat 5 h. Solidul s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu apă. Solidul s-a uscat sub vid pentru a permite obținerea 2-amino-6-hidroxinicotinatului de metil sub forma unui solid alb-murdar (25 g, randament = 78%). ^1H RMN (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10,92-10,76 (m, 1H), 7,65 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 7,43-6,87 (m, 2H), 5,51 (d, J = 9,5 Hz, 1H), 3,69 (s, 3H). Puritate LCMS = 99,32%; m/z = 169,32 (M+H). Absența TFA și a acidului triflic în produs s-a confirmat prin ^{19}F -NMR. Produsul s-a utilizat direct în etapa următoare fără purificare suplimentară.

Etapa 4: Prepararea 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinatului de metil



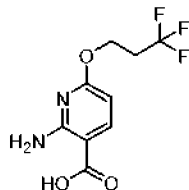
20 Peste o soluție agitată de 2-amino-6-hidroxinicotinat de metil (50 g, 297 mmoli) în THF (1000 ml) la 27 °C sub atmosferă de azot s-a adăugat trifenilfosfină (156 g, 595 mmoli). Masa de reacție s-a răcit la 0 °C și pest
e masa de reacție s-a adăugat în picătură azodicarboxilat de diizopropil ("DIAD" 116 ml, 595 mmoli). Soluția s-a agitat timp de 30 min. Peste soluție la 0 °C s-a adăugat o soluție de 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (52,4 ml, 595 mmoli) în THF (200 ml). Masa de reacție s-a lăsat apoi să se încălzească lent la 27 °C și
25 apoi s-a agitat la acea temperatură timp de 16 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO_2 , 10% EtOAc/Pet. Rf = 0,5). La terminare, amestecul de reacție s-a diluat cu apă (500 ml) și s-a extras cu EtOAc (2 x 500 ml). Straturile organice combinate s-au spălat cu apă (500 ml) și apoi saramură soluție (500 ml). Stratul organic s-a uscat pe Na_2SO_4 anhidru, s-a filtrat, și apoi s-a concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea produsul brut sub forma unui semi-solid galben (100 g). Acest material s-a purificat prin cromatografie cu silicagel eluând cu 5-10% EtOAc în pet. Frațiile conținând produsul dorit s-au colectat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinatului de metil sub forma unui lichid galben (50 g, randament 60%). ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 8,01 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,21-6,85 (brs, 1H), 6,04 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,50 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 3,84 (s, 3H), 2,63-2,55 (m, 2H). Metoda de analiză LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm 3 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în CAN; Gradient = Timp (min.) / %B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temp. coloană = 35 °C; Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 2,03 minute; ion observat = 265,15 (M+H); Puritate LCMS = 93%.

Etapa 5: Prepararea acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic

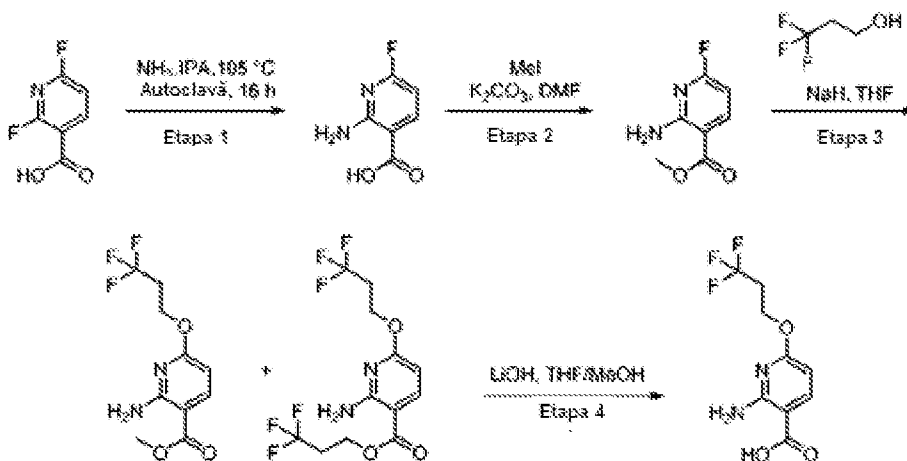


Peste o soluție agitată de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de metil (50 g, 189 mmoli) în tetrahidrofuran (THF) (500 ml), metanol (150 ml) și apă (80 ml) la 0 °C sub atmosferă de azot s-a adăugat monohidrat de hidroxid de litiu (22,66 g, 946 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 50°C timp de 16 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 50% EtOAc/Pet. Rf = 0,3). La terminare, amestecul de reacție s-a concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea unui reziduu apos. Reziduuul s-a acidulat apoi la pH 4 prin adăugare de HCl 1N. Precipitatul rezultat s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu apă (500 ml), apoi n-hexan (400 ml), și apoi s-a uscat pentru a permite obținerea acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic sub forma unui solid alb-murdar (45 g, randament 90%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO- d₆) δ: 12,47 (brs, 1H), 7,93 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,35 (brs, 2H), 5,98 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,44 (t, J = 6,1 Hz, 2H), 2,84-2,73 (m, 2H). Produsul s-a utilizat direct în etapa următoare fără altă purificare.

Prepararea alternativă a acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic

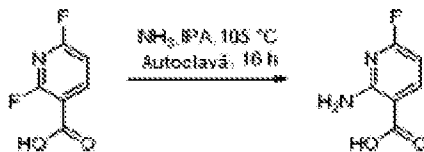


Schema de sinteză:



15

Etapa 1: Prepararea acidului 2-amino-6-fluoronicotinic



20

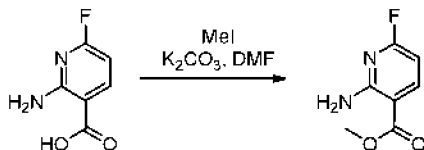
25

30

Un amestec de NH₃ în apă ("25% NH₃ în H₂O", 1 l, 4V) și izopropanol (6,5 l, 26V) la 0 °C s-a purjat amoniac gazos timp de 1 hr. Peste amestecul dintr-o autoclavă (25 l) s-a adăugat acid 2,6-difluoronicotinic (250 g, 1571 mmoli). Apoi, amestecul de reacție s-a agitat la 105 °C timp de 20 h. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 80% EtOAc/Pet. Rf = 0,3). La terminare, amestecul de reacție s-a lăsat să se răcească la 20 °C și apoi s-a concentrat la presiune redusă la temp. sub 20 °C până la un volum de 4-6V (1,5 l). Reziduuul s-a dizolvat în apă (5 l) și s-a acidulat la pH 2-3 prin adăugare de HCl 2N (700 ml) și apoi s-a agitat timp de 2 ore. Precipitatul rezultat s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu apă (4000 ml), apoi cu n-hexan (5000 ml), și apoi s-a uscat într-un cuptor cu vid la 50 °C pentru a permite obținerea acidului 2-amino-6-fluoronicotinic sub forma unui solid alb-murdar (250 g, randament 92%). Acest produs s-a amestecat cu produsul din alte șarje preparat prin același procedeu pentru a permite obținerea 2000 g produsul combinat. Solventul rezultat s-a îndepărtat de solide prin suspendarea solidelor în toluen (10 l) și apoi îndepărtarea toluenului prin distilare. Solidele rezultate s-au uscat într-un cuptor cu vid la 60 °C timp de 7 zile pentru a permite obținerea acidului 2-amino-6-fluoronicotinic sub forma unui solid alb-murdar (1,6 kg, randament 77%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,94 (brs, 1H), 8,17 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 7,56 (brs, 2H), 6,25 (dd, J = 8,2, 2,8 Hz, 1H). LCMS Method: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm 3 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min) %B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temperatură

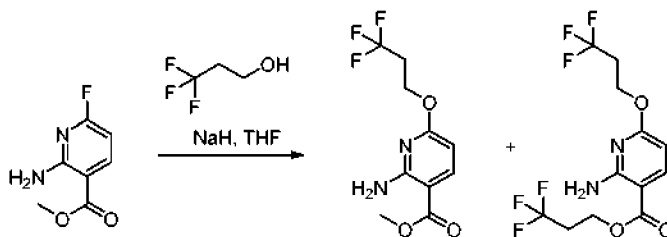
coloană = 35 °C; Debit= 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 1,24 minute; ion observat = 157,04 (M+H); Puritate LCMS = 96%.

Etapa 2: Prepararea 2-amino-6-fluoronicotinatului de metil



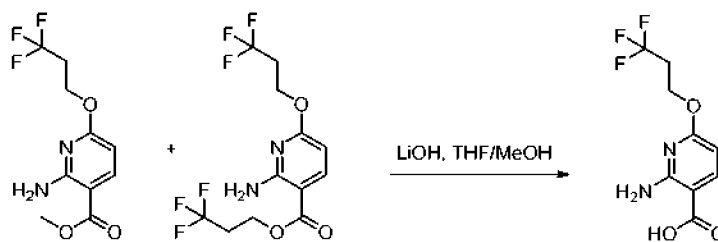
5 Peste o soluție agitată de acid 2-amino-6-fluoronicotinic (150 g, 961 mmoli) și carbonat de potasiu (398 g, 2882 mmoli) în DMF (1500 ml) s-a adăugat iodometan (300 ml, 4804 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 27 °C timp de 16 ore sub atmosferă de azot. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 30% EtOAc/Pet. Rf = 0,7). La terminare, amestecul de reacție s-a stins prin adăugare de apă răcită cu gheață (5000 ml). Precipitatul rezultat s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu apă (2000 ml),
10 apoi n-hexan (1000 ml), și apoi s-a uscat pentru a permite obținerea 2-amino-6-fluoronicotinatului de metil sub forma unui solid brun (120 g, randament 70%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,20 (t, J = 8,8 Hz, 1H), 7,54 (brs, 2H), 6,29 (dd, J = 8,4, 2,8 Hz, 1H), 3,82 (m, 3H). Metoda LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm 3 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min) /%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temp. coloană = 35 °C; Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 1,55 minute; ion observat = 171,07 (M+H); Puritate LCMS = 96%. Produsul s-a utilizat direct în etapa următoare fără altă purificare.

Etapa 3: Prepararea 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat și 3,3,3-trifluoropropil 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinatului de metil



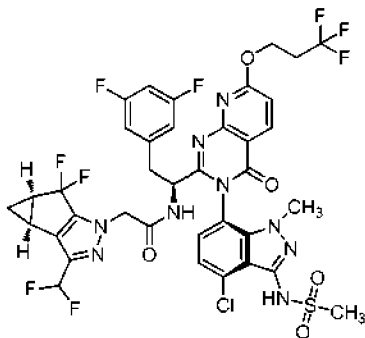
20 Peste o soluție agitată de 2-amino-6-fluoronicotinat de metil (25 g, 147 mmoli) și 3,3,3-trifluoropropan-1-ol (15,54 ml, 176 mmoli) în THF (500 ml) la 0 °C sub atmosferă de azot s-a adăugat în porții hidruură de sodiu (60% disp. în ulei, 8,82 g, 220 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 0 °C timp de 30 min și apoi s-a lăsat să se încălzească lent la 27 °C și s-a agitat la acea temperatură timp de 16 ore.
25 Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 10% EtOAc/Pet. Rf = 0,5). La terminare, amestecul de reacție s-a răcit 0 °C și s-a stins cu soluție apoasă saturată de NH₄Cl (300 ml). Amestecul s-a extras cu EtOAc (2 x 500 ml). Straturile organice combinate s-au spălat cu soluție de saramură (200 ml), s-au uscat pe anhidru Na₂SO₄, s-au filtrat, și apoi s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinatului de metil sub forma unui lichid galben (40 g). Formarea produsului secundar de trans-esterificare 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinatul de 3,3,3-trifluoropropil s-a observat, de asemenea, în reacție. Metoda LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm 3 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min) /%B: 0/97, 0,4/97, 2,5/2, 3,4/2, 3,5/97, 4,0/97; Temp. coloană = 35 °C; Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 2,04 & 2,22 minute; ion observat = 265,18 și 347,29 (M+H); Puritate LCMS = 57% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de metil și 15% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de 3,3,3-trifluoropropil. Acest amestec de produs brut s-a amestecat cu alte două șarje de produse brute preparate prin același procedeu (40 g și 50 g). Materialul combinat (130 g) s-a purificat prin cromatografie cu silicagel eluând cu 10-20% EtOAc în pet. Frațiile conținând produsul dorit s-au colectat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea
40 unui amestec 6:1 de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de metil și 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de 3,3,3-trifluoropropil sub forma unui lichid galben pal (100 g, randament 90%). ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,02-7,97 (m, 1H), 7,04-6,48 (m, 1H), 6,08-6,03 (m, 1H), 4,52-4,47 (m, 2H), 3,83 (s, 3H), 2,64-2,54 (m, 2H). Metoda LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min) /%B: 0/97, 0,4/97, 2,5/2, 3,4/2, 3,5/97, 4,0/97; Temp. coloană = 35 °C;
45 Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 2,02 și 2,21 minute; ion observat = 264,97 și 346,97 (M+H); Puritate LCMS = 66% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de metil și 11% de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de 3,3,3-trifluoropropil.

Etapa 4: Prepararea acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic

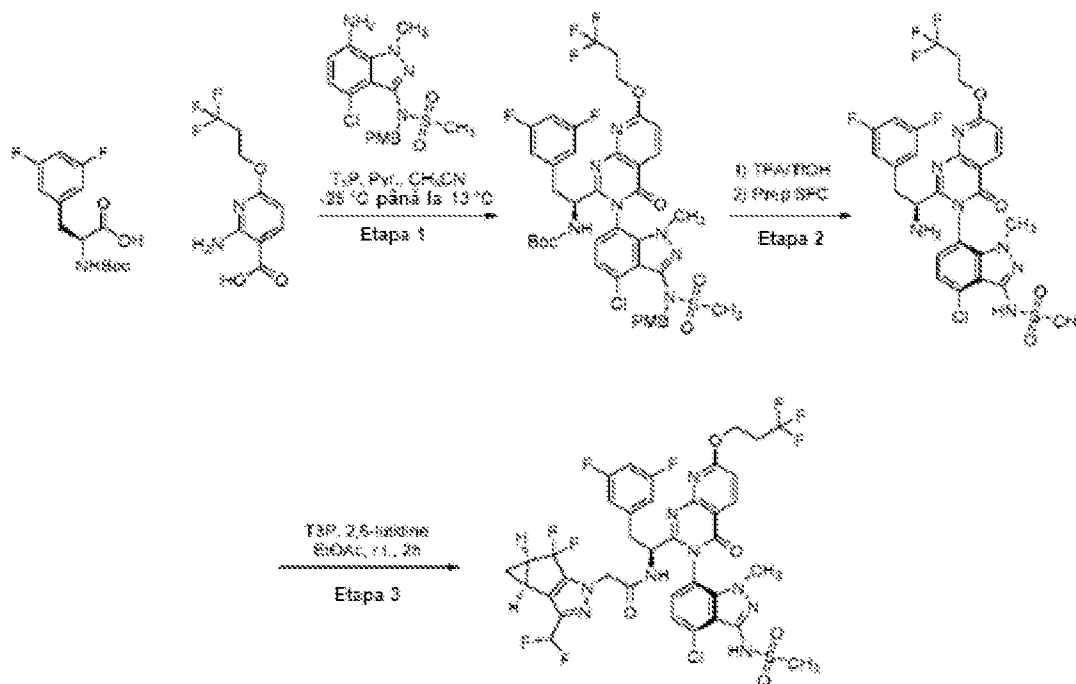


5 Peste o soluție agitată de 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de metil și 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinat de 3,3,3-trifluoropropil (6:1, 100 g, 310 mmoli) în tetrahidrofuran (THF) (800 ml), metanol (300 ml) și apă (200 ml) s-a adăugat la 27 °C sub atmosferă de azot monohidrat de hidroxid de litiu (37,2 g, 1552 mmoli). Amestecul de reacție s-a agitat la 50 °C timp de 8 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 50% EtOAc/Pet. R_f = 0,3). La terminare, amestecul de reacție s-a concentrat la presiune redusă și reziduul apos rezultat s-a acidulat apoi la pH 4 prin adăugare de HCl 1N. Precipitatul rezultat s-a colectat prin filtrare și s-a spălat cu apă (2000 ml), apoi n-hexan (1000 ml), și apoi s-a uscat pentru a permite obținerea acidului 2-amino-6-(3,3,3-trifluoro-propoxi)nicotinic sub forma unui solid alb-murdar (80 g, randament 97%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12,47 (brs, 1H), 7,93 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,33 (brs, 2H), 5,99 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,45 (t, J = 6,2 Hz, 2H), 2,83-2,74 (m, 2H). Metoda LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm 3 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05% în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min.)/%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temp. coloană = 35 °C; Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 1,73 minute; ion observat = 251,17 (M+H); Puritate LCMS = 94%. Produsul s-a utilizat direct în etapa următoare fără altă purificare.

10 *Prepararea alternativă a exemplului 1: N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido*
 20 *[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahydro-1H-cydopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă*

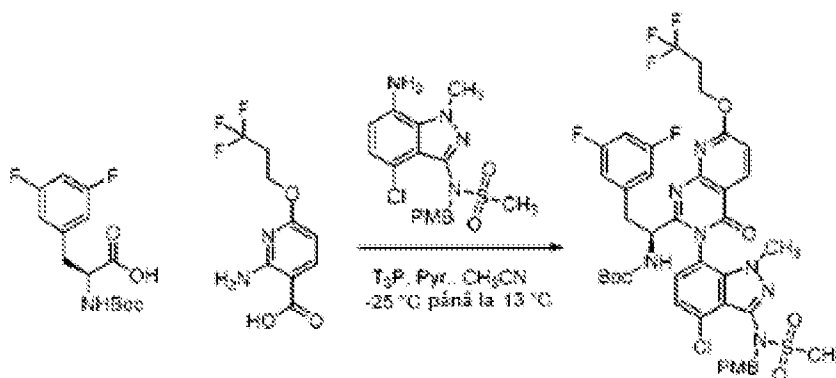


Schema de sinteză:



Etapa 1: Prepararea (S)-1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenzil)metil-sulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamatului de *tert*-butil

5



10 Peste o soluție agitată de acid (S)-2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)-3-(3,5-difluorofenil)propanoic (62,3 g, 207 mmoli) și acid 2-amino-6-(3,3,3-trifluoropropoxi)nicotinic (55 g, 207 mmoli) în acetonitril (600 ml) sub atmosferă de azot de la -25 °C s-a adăugat piridină (41,8 ml, 517 mmoli). Peste amestecul rezultat s-a adăugat în picătură timp de 15 min. 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrifosfină 2,4,6-trioxid ("T3P", 50% în greutate în EtOAc, 609 ml, 1033 mmoli). Soluția s-a agitat la -25 °C timp de 1 oră, apoi s-a lăsat să se încălzească lent la 13 °C și s-a agitat timp de 5 ore. Peste soluție la 13 °C s-a adăugat N-(7-amino-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)-N-(4-metoxibenzil)metansulfonamidă (82 g, 207 mmoli). Masa de reacție s-a lăsat apoi să se încălzească lent la 27 °C și apoi s-a agitat la acea temperatură timp de 16 ore. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 40% EtOAc/Pet. R_f = 0,4). La terminare, amestecul de reacție s-a concentrat la presiune redusă. Reziduuul s-a dizolvat în EtOAc (500 ml) și apoi s-a spălat cu acid citric apos (0,5M, 2 x 500 ml) urmat de NaOH apos (1N, 3 x 500 ml). Stratul organic s-a uscat pe Na₂SO₄, s-a filtrat și apoi s-a concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea produsului brut (180 g) care s-a purificat prin cromatografie cu silicagel eluând cu 40-50% EtOAc în pet. Frațiile conținând produsul dorit s-au colectat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea (S)-1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenzil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamate de *tert*-butil sub forma unui solid alb-murdar (85 g, randament 39%). Produsul este un amestec de atropizomeri homochirali

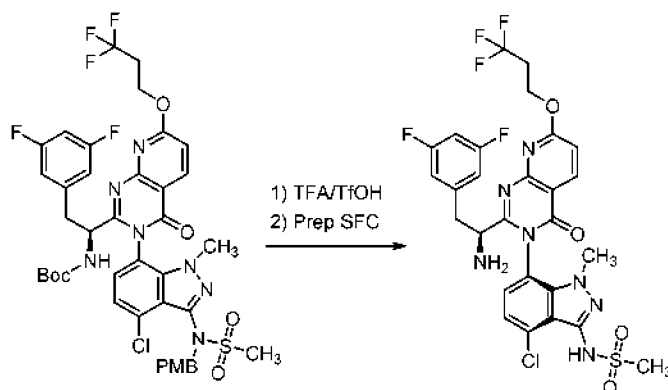
15

20

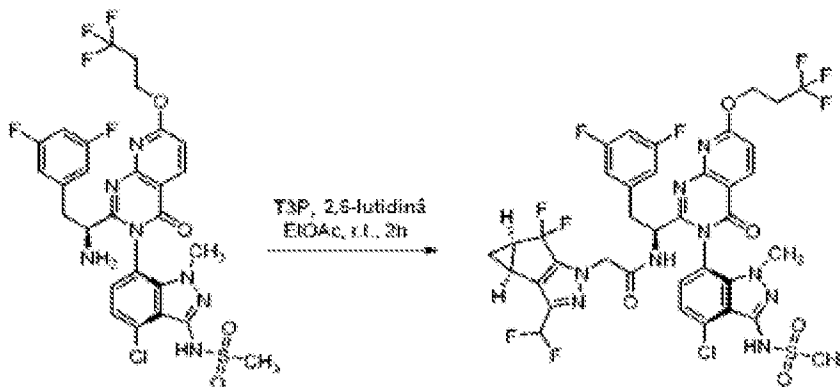
25

(diastereoizomeri). Metoda LCMS: Coloană = Acquity BEH C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm); Fază mobilă A = acid formic 0,05 în apă; Fază mobilă B = acid formic 0,05% în acetonitril; Gradient = Timp (min)/%B: 0/3, 0,4/3, 2,5/98, 3,4/98, 3,5/3, 4/3; Temp. coloană = 35 °C; Debit = 0,6 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 2,46 minute; ion observat = 892,53 (M+H); Puritate LCMS = 85%.

- 5 Etapa 2: Prepararea (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidei



- Peste o soluție agitată de (S)-1-(3-(4-cloro-3-(N-(4-metoxibenzil)metilsulfonamido)-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)carbamatului de terț-butil (85 g, 95 mmoli) în DCM (300 ml) la 0 °C s-a adăugat acid trifluoroacetic (TFA, 294 ml, 3810 mmoli) urmat de acid triflic (25,4 ml, 286 mmoli). Soluția s-a lăsat să se încălzească la 27 °C s-a agitat timp de 1 h sub atmosferă de azot. Progresul reacției s-a monitorizat prin TLC (SiO₂, 80% EtOAc/Pet. R_f = 0,3). La terminare, substanțele volatile s-au îndepărtat sub un curent blând de azot gazos. Reziudul s-a dizolvat în EtOAc (1000 ml) și s-a spălat cu NaOH 2N (2 x 500 ml) și apoi saramură (500 ml). Stratul organic s-a uscat pe Na₂SO₄, s-a filtrat, și apoi s-a concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea produsului brut care s-a purificat prin cromatografie de silicagel eluând cu 50-99% EtOAc în pet. Frațiile conținând produsul dorit s-au colectat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidei sub forma unui solid galben deschis (63 g). Materialul este un amestec de atropizomeri homochirali (diastereoizomeri) într-un raport 64:26 determinat prin LCMS. Acest produs s-a amestecat cu încă trei șarje de produși preparați urmând același procedeu. Produsul combinat (195 g) s-a dizolvat în metanol:acetonitril (80:20, 1300 ml) și această soluție s-a purificat prin prep-SFC utilizând următoarea metodă: Coloană = (R,R) Whelk-01 (250 x 30 x 5μ); eluent = CO₂:MeOH (65:35); Debit = 90 g/min; Contrapresiune = 120 bar; Detecție = 214 nm (UV); Timp de stivuire = 14 min; Încărcătură per injecție = 430 mg. Vârful major pur s-a colectat și s-a concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea stereoisomerului unic (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamida sub forma unui solid alb-murdar (113 g, randament 63%). ¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,42 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 7,43 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,37 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,06 (d, J = 8,8 Hz, 1H) 7,03-6,97 (m, 1H), 6,75-6,70 (m, 2H), 4,73-4,69 (m, 2H), 3,68 (s, 3H), 3,58-3,52 (m, 1H), 3,28-3,24 (m, 1H), 3,22 (s, 3H), 2,97-2,83 (m, 3H). Metoda LCMS: Coloană = XBridge C18 (75 mm x 4,6 mm, 3,5 μm); Fază mobilă A = bicarbonat de amoniu 5 mM în apă; Fază mobilă B = acetonitril; Gradient = Timp (min)/%B: 0/5, 0,5/5, 1,0/15, 4,0/98, 7,0/98, 7,5/5, 8,0/5; Coloană Temp = 35 °C; Debit = 1,3 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 4,03 minute; ion observat = 672,07 (M+H); Puritate LCMS = 98%; Puritate HPLC = 98%; Puritate HPLC Chirală = 98%.
- Etapa 3: Prepararea N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropano[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidei



Peste o soluție agitată de (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidă (55 g, 82 mmoli) și acid 2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetic (22,70 g, 86 mmoli) în acetat de etil (818 ml) s-a adăugat 2,6-lutidină (23,83 ml, 205 mmoli). Peste amestec s-a adăugat în picătură 2,4,6-trioxid de 2,4,6-tripropil-1,3,5,2,4,6-trioxatrifosfinan ("T3P", 50% în greutate în acetat de etil) (97 ml, 164 mmoli) moment în care temperatura internă a crescut de la 17 °C la 24 °C. Amestecul s-a agitat timp de 2 ore la temperatura camerei. Reacția s-a stins prin adăugare de apă (500 ml). Fazele s-au separat și faza organică s-a spălat cu apă (500 ml), apoi s-a uscat pe Na₂SO₄. Amestecul s-a filtrat și filtratul s-a concentrat la 1/4 din volumul original pentru a permite obținerea produsului brut sub formă de soluție în acetat de etil.

O a doua șarjă de produs s-a preparat conform aceleiași procedeu modificat după cum urmează: reacția s-a efectuat utilizând (S)-N-((6P)-7-((3P)-2-(1-amino-2-(3,5-difluorofenil)etil)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)pirido[2,3-d]pirimidin-3(4H)-il)-4-cloro-1-metil-1H-indazol-3-il)metansulfonamidă (53,4 g, 79 mmoli) și cantitățile tuturor celorlalți reactanți s-au ajustat corespunzător. Prelucrarea s-a încheiat cu o spălare cu saramură (300 ml) înainte de uscare pe MgSO₄.

Produsele brute s-au combinat și apoi s-au adsorbit pe Celită. Pudra rezultată s-a supus cromatografiei cu silicagel (3 kg coloană RediSep Gold) eluând cu 30-85% acetat de etil în hexani. Frațiile conținând produsul dorit s-au colectat și s-au concentrat la presiune redusă pentru a permite obținerea unei spume galbene. Materialul s-a plasat sub vid înaintat timp de 18h. Materialul s-a transformat într-o pulbere fină utilizând un mojar și un pistil și solidele s-au plasat în cuptor cu vid la 50 °C timp de 48 h pentru a permite obținerea N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3singlet larg,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidei sub forma unei pulberi galbene (134,1 g, randament 90%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 9,84 - 9,91 (1 H, m) 9,49 (1 H, d, *J*=8,34 Hz) 8,47 (1 H, d, *J*=8,35 Hz) 7,79 (1 H, d, *J*=7,75 Hz) 7,49 (1 H, d, *J*=8,05 Hz) 7,11 (1 H, d, *J*=8,64 Hz) 6,80 - 7,09 (2 H, m) 6,66 (2 H, dd, *J*=8,20, 2,24 Hz) 4,69 - 4,75 (3 H, m) 4,57 (1 H, d, *J*=16,39 Hz) 4,48 (1 H, ddd, *J*=11,03, 8,35, 2,68 Hz) 3,51 (3 H, s) 3,42 (1 H, dd, *J*=14,01, 2,38 Hz) 3,20 (3 H, s) 3,05 (1 H, dd, *J*=14,01, 11,03 Hz) 2,89 - 2,99 (2 H, m) 2,42 - 2,48 (2 H, m) 1,32 - 1,40 (1 H, m) 0,81 - 0,86 (1 H, m). Metoda LCMS: Coloană = Acquity UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, particule 1,7 μm); Solvent A = Apă:MeCN (95:5) cu Acid formic 0,1% v/v; Solvent B = MeCN:Apă (95:5) cu Acid formic 0,1% v/v; Gradient = Timp (min)/%B: 0/0, 3,5/100, 4,5/100; Debit = 0,8 ml/min. Rezultat LCMS: timp de retenție = 3,173 min; masa observată = 917,95 (M+H). Puriție UPLC = 99,8%.

Denumirea exemplului 1:

Compusul din Exemplul 1 preparat ca mai sus este un material care conține chiralitate axială. Chiralitatea axială poate fi descrisă utilizând nomenclatura P/M detaliată în IUPAC Gold Book (doi:10.1351/goldbook.A00547). Totuși, în acest moment sunt disponibile numai un număr limitat de unelte software care sunt capabile să genereze denumiri chimice conținând nomenclatura P/M, și încă și mai puține opțiuni sunt disponibile pentru a transforma denumirile chimice utilizând această nomenclatură în reprezentări structurale ale moleculelor. De aceea, pentru claritate și comoditate mai multe nume pentru Exemplul 1 sunt furnizate mai jos:

Denumirea Exemplului 1 generată de ChemDraw Ultra 12 (nomenclatura P/M absentă) este: N-((S)-1-(3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă

Denumirea chimică a Exemplului 1 generată de JChem pentru Excel (inclusiv nomenclatura P/M) este: N-[(1S)-1-[(3P,3P)-3-(4-cloro-3-metansulfonamido-1-metil-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3H,4H-pirido[2,3-d]pirimidin-2-il]-2-(3,5-difluorofenil)etil]-2-[(2S,4R)-9-(difluorometil)-5,5-difluoro-7,8-diazatriciclo[4,3,0,0^{2,4}]nona-1(6),8-dien-7-il]acetamidă

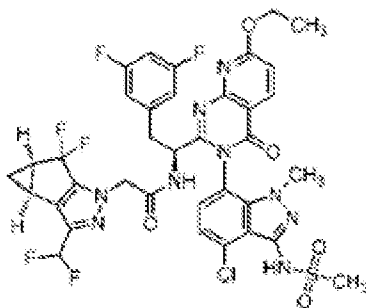
5 Denumirea chimică generată de ChemDraw Ultra 12 cu nomenclatura P/M adăugată manual este: N-((S)-1-((3P)-3-(4-cloro-1-metil-3-(metilsulfonamido)-1H-indazol-7-il)-4-oxo-7-(3,3,3-trifluoropropoxi)-3,4-dihidropirido[2,3-d]pirimidin-2-il)-2-(3,5-difluorofenil)etil)-2-((3bS,4aR)-3-(difluorometil)-5,5-difluoro-3b,4,4a,5-tetrahidro-1H-ciclopropa[3,4]ciclopenta[1,2-c]pirazol-1-il)acetamidă

Teste comparative:

10 Compusul din Exemplul 1 a fost comparat cu compusul din Exemplul 60.2 descris în WO2018203235 (Schema 1) într-un număr de teste. În scopul acestor comparații, am ales să folosim material homochiral al fiecărui compus, deoarece acest nivel de puritate este cel mai reprezentativ pentru ceea ce ar fi utilizat în studiile clinice umane. În mod specific, rotația restrânsă în jurul legăturii C-N indicate a indazolului dă naștere la atropizomeri (diastereomeri) atât în Exemplul 1, cât și în Exemplul

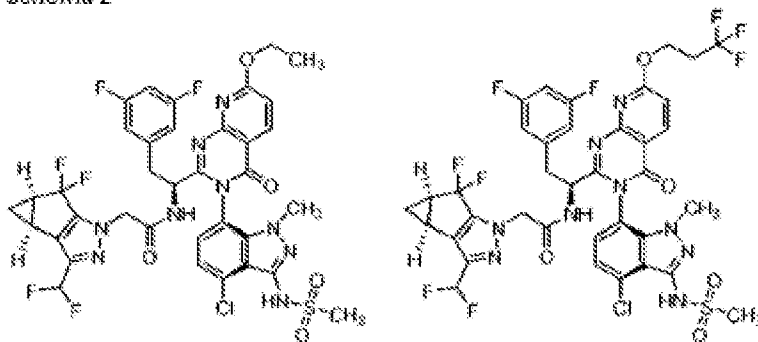
15 60.2 care pot fi separați prin cromatografie și nu se interconversează la temperatura camerei. Astfel, prin cromatografie am izolat în formă pură stereoisomerii reprezentați în Schema 2.

Schema 1



Exemplul 60.2 descris ca
în WO2018203235

Schema 2



Exemplul 60.2 care descrie stereochemia
materialului homochiral utilizat în testele
comparative descrise

Exemplul 1 al prezentului brevet care descrie
stereochemia materialului homochiral utilizat în
testele comparative descrise

Procedura generală pentru cuantificarea compusului prin LC-MS/MS:

20 Toate probele *in vitro* au fost injectate pe un sistem Exion LC 4500 Triple Quad™ LC-MS/MS. Coloana analitică utilizată a fost un Phenomenex C18 (C18, 4,6 mm x 50 mm, 5 μm) menținută la temperatura camerei. Faza mobilă A a constat din acid formic 0,1% (v/v) în apă MilliQ. Faza mobilă B a constat din metanol 100%. Debitul a fost de 1 ml/min. Gradientul a fost după cum urmează: faza mobilă B a fost crescută liniar de la 5% la 90% în 0,7 minute, menținută la 90% timp de 1,4 minute și menținută

25 la 5% timp de 0,7 minute.

Toate probele *in vivo* au fost injectate pe un sistem Triple Quad™ 6500 LC-MS/MS cu coloane menținute la 60°C. Faza mobilă A a constat din H₂O, 1 mM NH₄OAc, 0,025% acid formic. Faza mobilă B a constat din MeOH, NH₄OAc 5mM. Debitul a fost de 0,6 ml/min. Coloana și gradientul de eluție au fost selectate dintr-una dintre metodele generale de analiză descrise mai jos.

30 Metoda generală de analiză A:

Coloană = Waters X-Bridge BEH C18 (2,1 x 50 mm, particule de 1,7 μm); Gradient: Timp (min.)/%B = 0,0/10, 0,2/10, 0,8/90, 1,3/90, 1,31/10, 2,0/10.

Metoda generală de analiză B:

5 Coloană = Waters BEH C18 (particule de 2,1 x 50 mm, 2,5 μm); Gradient: Timp (min.)/%B = 0,0/10, 0,2/10, 0,8/90, 1,3/90, 1,31/10, 2,0/10.

Metoda generală de analiză C:

Coloană = Waters BEH C18 (particule de 2,1 x 50 mm, 1,7 μm); Gradient: Timp (min.)/%B = 0,0/2, 0,40/2, 0,7/65, 1,3/90, 1,9/90, 1,91/2, 2,5/2.

Procedura de măsurare a potenței și citotoxicității:

10 Celulele MT-2, celulele 293T și clona de ADN proviral a virusului NL₄₋₃ au fost obținute din programul de cercetare și reactiv de referință NIH SIDA. Celulele MT-2 au fost propagate în mediu RPMI 1640 suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS) inactivat la căldură, 100 mg/ml penicilină G și până la 100 unități/ml streptomycină. Celulele 293T au fost propagate în mediu DMEM suplimentat cu 10% FBS inactivat la căldură, 100 mg/ml penicilină G și 100 mg/ml streptomycină. O clonă provirală recombina

15 recombinantă NL₄₋₃, în care o secțiune a genei nef a fost înlocuită cu gena luciferazei Renilla, a fost utilizată pentru a face virusul de referință utilizabil în aceste studii. Virusul recombinant a fost preparat prin transfecția clonei provirale recombinante NL₄₋₃ în celule 293T utilizând reactivul de transfecție Transit-293 de la Mirus Bio LLC (Madison, WI). Supernatantul a fost recoltat după 2-3 zile și cantitatea de virus prezentă a fost titrată în celule MT-2 utilizând activitatea enzimei luciferază ca marker prin măsurarea activității enzimei luciferază. Luciferaza a fost cuantificată utilizând substratul celular EnduRen Live de la Promega (Madison, WI). Activitățile antivirale ale compușilor față de virusul recombinant au fost cuantificate prin măsurarea activității luciferazei în celulele MT-2 infectate timp de 4-5 zile cu virusul recombinant în prezența diluțiilor în serie ale compusului.

25 Concentrația eficientă de 50% (EC₅₀) a fost calculată utilizând forma exponențială a ecuației efectului median unde (Fa) = 1/[1+ (ED₅₀/conc. medicament)^m] (Johnson VA, Byington RT. Infectivity Assay. In Techniques in HIV Research, ed. Aldovini A, Walker BD.71-76, New York: Stockton Press.1990). Concentrația inhibitorie de 50% (EC₅₀) a fost calculată utilizând forma exponențială a ecuației efectului median în care procentul de inhibare = 1/[1 + (EC₅₀/concentrație de medicament)^m], unde m este un parametru care reflectă panta concentrație-curbă de răspuns.

30 Citotoxicitatea compusului și valorile CC₅₀ corespunzătoare au fost determinate folosind același protocol ca cel descris în testul antiviral, cu excepția faptului că au fost utilizate celule neinfectate. Citotoxicitatea a fost evaluată în ziua 4 în celulele MT2 neinfectate utilizând un test colorimetric pe bază de XTT (2,3-bis[2-Metoxi-4-nitro-5-sulfopenil]-2H-tetrazolium-5-carboxianilide sare internă) (Sigma). - Aldrich, St Louis

35 **Rezultate:**

Potența Exemplului 1 și a Exemplului 60,2 se află în eroarea testului inițial de virusologie anti-HIV (EC₅₀ Exemplul 1 = 25 ± 8 pM, EC₅₀ Exemplul 60.2 = 18 ± 13 pM). De reținut faptul că EC₅₀ din Exemplul 1 a fost de 0,034 nM când a fost testat inițial, totuși, testarea ulterioară a dus la o medie revizuită de 25 ± 8 pM. Citotoxicitatea CC₅₀ măsurată este > 0,5 μM și, respectiv, > 10 μM în exemplul 1 și respectiv în Exemplul 60.2. Procedura de măsurare a metabolismului în microzomii hepatice:

40 Microzomii hepatice de la om, câine, șobolan și maimuță au fost dezghețați și diluați la o concentrație finală de 1 mg/ml în tampon fosfat de potasiu 100 mM (pH 7,4). Compușii de testare și martorii s-au preparat la concentrația finală de 100x de 1 μM în acetonitril:apă 1:1 (v/v) și alicotate în amestec microzomal. Amestecul a fost preincubat la 37°C într-o baie de apă agitată timp de 10 minute.

45 Probele pentru incubare au fost efectuate în dublu exemplar. Trei martori au fost incluși în probele pentru incubare: warfarină, fenacetină și verapamil. După preincubare, reacția a fost inițiată cu NADPH la o concentrație finală de 1 mM. La 0, 5, 15, 30, 45 și 60 de minute, 25 μl de probă s-au prelevat și s-au stins cu 300 μl de acetonitril conținând standard intern (Telmisartan). Probele au fost agitate în vortex timp de 5 minute la 1200 rpm și apoi centrifugate la 4000 rpm timp de 10 minute. O parte alicotă de 100 μl de supernatant a fost diluată de trei ori cu apă și injectată pe un sistem Exion LC 4500 Triple Quad LC-MS/MS. Rezultatele au fost raportate ca procent din partea părinte rămasă și au fost calculate din rapoartele suprafeței de vârf ale compusului de testat rămas după fiecare moment de timp și comparate cu incubarea de la momentul zero.

50 **Rezultate:**

55 Exemplul 1 este de șase ori mai stabil în microzomii ficatului de câine decât Exemplul 60.2, iar Exemplul 1 este de cel puțin două ori mai stabil în microzomii ficatului de maimuță decât Exemplul 60.2. Aceste date sugerează că Exemplul 1 ar trebui să fie semnificativ mai stabil decât Exemplul 60.2 la metabolismul *in vivo* la câine și maimuță.

Tabelul 1.

<i>Stabilitate microzom hepatic</i>	Exemplul 1	Exemplul 60,2
T _{1/2} microzom hepatic uman	> 120 min.	> 120 min.
T _{1/2} microzom hepatic de șobolan	> 120 min.	> 120 min.
Microzom hepatic de câine T _{1/2}	105 min.	17 min.
T _{1/2} microzom hepatic de maimuță	> 120 min.	55 min.

Procedura de măsurare a metabolismului în hepatocitele umane:

5 Hepatocitele crioconservate în suspensie de la om, maimuță, câine, șobolan și șoarece au fost dezghețate și diluate în mediu William's E preîncălzit (pH 7,4). Părți alicote din suspensia de hepatocite au fost adăugate la soluțiile de lucru ale compusului de testat preparate în mediu William's E preîncălzit (pH 7,4) pentru a obține concentrații finale de 0,5 μM în 0,5 x 10⁶ celule per mililitru și ≤0,25% DMSO. Aceste probe au fost incubate la 37°C cu 5% dioxid de carbon și agitarea la 200 rpm. Probele pentru incubare au fost efectuate în singlet. La momentele 0, 10, 30, 60, 120 și 240 minute, o parte alicotă de 50 μl din amestecurile de incubare a fost îndepărtată și adăugată la o soluție de 100 μl de acetonitril conținând standardul intern și amestecul a fost agitat și apoi centrifugat la 4°C și 3500 rpm timp de 15 minute. După finalizarea experimentului, probele au fost analizate prin LC-MS/MS. Rezultatele stabilității metabolice au fost raportate ca procent din compusul de testat părinte rămas. Acest procent este calculat prin împărțirea raportului de suprafață de vârf al compusului de testat după incubare (t_x) la raportul de suprafață de vârf al compusului de testat la momentul zero (t₀) chiar înainte de incubare.

15 Constanta vitezei de eliminare (k, min⁻¹) este calculată utilizând potrivirea regresiei neliniare cu următoarea ecuație:

$$C_t = C_0 \times e^{(-k \times t)}$$

unde:

20 C₀ este concentrația inițială reprezentată ca raportul zonei picului (aria vârfului compusului de testat/aria vârfului standard intern);

C_t este concentrația la t reprezentată ca raportul ariei (aria vârfului compusului de testat/aria vârfului standard intern); e este baza logaritmului natural

t este timpul (min);

25 k este constanta vitezei de eliminare (min⁻¹).

Timpul de înjumătățire (t_{1/2}, min) se calculează folosind următoarea ecuație:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$$

unde:

k este constanta vitezei de eliminare (min⁻¹).

30 Clearance-ul intrinsec *in vitro* (CL_{int}, ml/min/milion de celule) este calculat folosind următoarea ecuație:

$$CL_{int} = 0.693 / t_{1/2} / n$$

unde:

t_{1/2} este timpul de înjumătățire;

35 n este numărul de celule pe ml.

Rezultate:

Timpul de înjumătățire din Exemplul 1 în hepatocitele umane a fost calculat a fi >480 minute în timp ce timpul de înjumătățire din Exemplul 60,2 în hepatocitele umane a fost calculat a fi de 350 de minute. Clearance-ul intrinsec al Exemplului 60,2 în hepatocitele umane este de 0,465 ml/min/g de ficat, care este de 1,5 ori mai rapid decât clearance-ul hepatic de 0,312 ml/min/g găsit în Exemplul 1,

Procedura de măsurare a parametrilor farmacocinetici (PK) *in vivo*:

PK a fost investigată la șoareci CD1 masculi, șobolani Wistar Han, maimuțe Cynomolgus și câini Beagle. Două grupuri de animale (N = 3 per grup) au primit compusul de testat fie ca doză intravenoasă (IV) (1 mg/kg) fie prin gavaj oral (5 mg/kg soluție și suspensie). Medicamentul a fost formulat în 90% PEG 400, 10% etanol pentru administrare IV și în 90% PEG400, 5% etanol pentru administrare PO. Au fost recoltate probe de sânge la 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72 și 96 de ore după doza IV; 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72 și 96 de ore după doza orală. Probele de sânge

au fost colectate în tuburi K₃EDTA și centrifugate la 1500 până la 2000 x g pentru a obține plasmă. Probele de plasmă au fost păstrate la -20°C până la analiza prin LC-MS/MS. Toate probele *in vivo* au fost injectate pe un sistem Exion LC 4500 Triple Quad™ LC-MS/MS unde coloana a fost menținută la 60 °C și debitul a fost de 0,6 ml/min. Toți parametrii de analiză LC-MS/MS sunt capturați electronic în fișierele de date brute. Probele de PK de șobolan IV, câine IV, maimuță IV și maimuță PO PK au fost analizate prin metoda generală de analiză A. Probele de șobolan IV, șoarece PO și PK de câine PO au fost analizate prin metoda generală de analiză B. Probele de PO de șobolan au fost analizate prin metoda generală de analiză C.

Parametrii PK au fost obținuți prin analiza necompartimentală a concentrației plasmatice în funcție de timp (Phoenix WinNonlin v8,1). Concentrația maximă (C_{max}) și timpul pentru C_{max} (T_{max}) au fost înregistrate direct din observațiile experimentale. Aria de sub curba de la momentul zero până la ultimul timp de eșantionare [AUC_{0-T}] și aria de sub curba de la momentul zero la infinit [AUC_{INF}] au fost calculate utilizând regula trapezoidală liniar-log. Clearance-ul plasmatic total (CL_{Tp}), volumul de distribuție la starea de echilibru (V_{ss}), timpul de înjumătățire prin eliminare aparent (T-HALF) și timpul mediu de rezidență (MRT) au fost estimate după administrarea IV. Estimările AUC și T-HALF au fost făcute folosind un minim de trei momente de timp cu concentrații cuantificabile. Biodisponibilitatea orală absolută (F) a fost estimată ca raport dintre valorile ASC normalizate în funcție de doză după dozele orale și IV.

Rezultate:

Parametrii farmacocinetici IV (PK) din Exemplul 1 și din Exemplul 60.2 au fost măsurați la patru specii preclinice: șoarece, șobolan, câine și maimuță. Exemplul 1 a prezentat clearance-ul îmbunătățit la toate cele patru specii în comparație cu Exemplul 60.2. În concordanță cu rezultatele testului microzomului hepatic menționat mai sus, diferențele de clearance au fost cele mai semnificative pentru câine și maimuță, unde clearance-ul a fost îmbunătățit de 4,9 ori, respectiv de 2,6 ori. De asemenea, timpul de înjumătățire al Exemplului 1 în circulație la câine și maimuță a fost de 3,4 ori și, respectiv, de două ori mai mare decât în Exemplul 60.2.

Tabelul 2.

Parametri PK Exemplul 1	Unitate	Șoarece	Șobolan	Maimuță	Câine
CL	ml/min/kg	0,50	2,64	8,50	1,68
V _{ss}	L/kg	0,24	3,34	1,18	0,83
T _{1/2}	h	7,6	17,4	3,0	8,6
Parametri PK Exemplul 60.2	Unitate	Șoarece	Șobolan	Maimuță	Câine
CL	ml/min/kg	5,20	5,89	22,2	8,21
V _{ss}	L/kg	2,14	2,86	1,34	0,96
T _{1/2}	h	5,2	11,0	1,4	2,5

Înainte ca un potențial medicament să poată intra în studiile clinice umane, siguranța compusului ar trebui, de obicei, evaluată la două specii preclinice: o rozătoare și una non-rozătoare. Aceste specii sunt de obicei șobolani și fie câini, fie maimuțe. Un obiectiv al unui studiu de siguranță *in vivo* este de a obține concentrații de medicament în circulație care sunt de multe ori mai mari decât cele așteptate dacă unui om i s-ar administra o doză eficientă de medicament. Diferența între concentrațiile de medicament atinse în studiul de siguranță față de concentrațiile de medicament care ar fi de așteptat la o persoană care ia o doză eficientă de medicament este numită „marjă”. Obținerea unor marje mari într-un studiu de siguranță este importantă deoarece, pe măsură ce marjele cresc, crește și încrederea că, dacă ar fi posibil un eveniment advers legat de medicament, acesta ar fi observat în timpul evaluării preclinice de siguranță.

Parametrii PK îmbunătățiți la șobolan, câine sau maimuță înseamnă că ar fi necesară o doză mai mică de compus pentru a obține o concentrație mare de medicament în circulație pentru aceste specii preclinice. De aceea, unei maimuțe sau câine cărora li s-a administrat o doză din Exemplul 1 ar atinge marje mai mari decât dacă i s-ar administra o doză de aceeași mărime din Exemplul 60.2. Datorită limitărilor practice ale mărimii dozei, marja (și de aceea încrederea) care ar putea fi atinsă cu Exemplul 1 într-un studiu de evaluare a siguranței fără rozătoare este mai mare decât marja care ar putea fi atinsă cu Exemplul 60.2.

Procedura de scalare alometrică a parametrilor preclinici PK pentru a oferi o predicție a dozei la om:

Predicțiile de doză umană au fost efectuate folosind software-ul Phoenix WinNonlin (v 8,0) și Microsoft Excel utilizând add-in-ul ModelRisk pentru modelarea populației. Estimările umane pentru

CL_{TP} ale fiecărui compus au fost obținute pe baza scalei alometrice medii a datelor IV de șoarece, șobolan, maimuță și câine (factor de scalare a greutateii corporale de 0,75) și o medie (factor de scalare a greutateii corporale de 1,0) de la toate speciile pentru Vss. Parametrii IV umani (Vc, Ka, K₁₂, K₂₁, Kel) au fost determinați utilizând scalarea timpului mediu de rezidență (MRT) de la specii preclinice (șoarece, șobolan, câine și cyno) folosind estimările umane Vss și CL_{TP}. Absorbția (Ka) a fost determinată prin deconvoluție (PO) sau din timpul de înjumătățire (SC) la speciile preclinice ($Ka = \ln(2)/t_{1/2}$). Doza umană estimată pentru PO și SC este calculată ținând cont de variabilitatea umană și este calculată pentru a acoperi 95% din populația umană.

Rezultate:

Parametrii PK preclinici ai speciilor sunt utilizați în mod obișnuit pentru a prezice parametrii PK umani înainte de studiile clinice pe om. Metodele folosite pentru această predicție se numesc „scalare alometrică” și sunt, în general, discutate și practicate în literatură. Folosind scalarea alometrică, doza orală prevăzută o dată pe zi necesară pentru a menține o concentrație plasmatică eficientă a medicamentului la om este de 7 ori mai mică de Exemplu 1 decât de Exemplu 60.2. În mod specific, doza estimată QD PO umană din Exemplul 1 este mai mică de 10 mg în timp ce doza estimată QD PO umană din Exemplul 60.2 este mai mare de 30 mg.

În timp ce reacțiile medicamentoase idiosincratice (adică, reacțiile de hipersensibilitate) sunt imprevizibile și grave în natură, și astfel reprezintă o problemă clinică semnificativă, s-a afirmat că medicamentele administrate la o doză zilnică de 10 mg sau mai puțin sunt rareori sau vreodată asociate cu o incidență ridicată. of idiosyncratic drug Reacțias (Utrecht, J. P. New Concepts in Immunology Relevant to Idiosyncratic Drug Reactions: The "Danger Hypothesis" și Innate Immune System. Chem. Res. Toxicol. 1999, 12(5), 387-395, DOI:10.1021/tx980249i).

Procedura de măsurare a parametrilor farmacocinetici într-un experiment subcutanat *in vivo*:

Medicamentul a fost formulat în Kolliphor P188 1%/1% PEG3350/3,5% manitol/94,5% apă și apoi a fost administrat la șobolani Wistar Han sub formă de injecție subcutanată la o doză de 20 mg/kg. Au fost recoltate probe de sânge la 0,167, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 96 de ore și apoi la fiecare 3 zile timp de până la 122 de zile. Probele de sânge au fost colectate în tuburi K3EDTA și centrifugate la 1500 până la 2000 x g pentru a obține plasmă. Probele de plasmă au fost păstrate la -20°C până la analiza prin LC-MS/MS.

Rezultate:

Adecvarea fiecărui compus pentru administrarea subcutanată (SC) a fost evaluată într-un experiment SC PK la șobolan. După cum s-a determinat prin acest experiment, timpul de înjumătățire aparent al compusului în plasmă a fost de 13 zile pentru Exemplu 1 și 11,5 zile pentru Exemplu 60.2. ASC_{0-infinit} exemplului 1 a fost de 4,941 zile*ng/ml (2,89% din ASC extrapolată). AUC_{0-infinit} exemplul 60.2 a fost de 609 zile*ng/ml (12,8% din AUC extrapolată). Biodisponibilitatea a fost 93% pentru Exemplul 1 și 25% pentru Exemplul 60.2. Concentrațiile de medicament au fost menținute peste 7 ng/ml pentru toate animalele timp de 73 de zile cu Exemplul 1 și 24 de zile cu Exemplul 60.2 (Figura 1). Dozele preconizate o dată pe lună subcutanate (Q1M SC) pentru om au fost calculate utilizând timpii de înjumătățire aparent și biodisponibilitatea derivate din PK de șobolan SC în combinație cu valorile de clearance-ul uman prezise derivate din scalarea alometrică. Doza prevăzută Q1M SC necesară pentru a menține o concentrație plasmatică eficientă a medicamentului la om este de 15 ori mai mică pentru Exemplul 1 decât de exemplul 60.2.

Procedura de măsurare a inducției citocromului P450 în hepatocite umane crioconservate:

Urmând îndrumările FDA („*In vitro* Metabolism- și Transporter- Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry”), potențialul Exemplului 1 și al Exemplului 60.2 de a induce expresia CYP2B6 a fost testat folosind hepatocite de la aceiași trei donatori individuali (mai degrabă decât de la donatori reuniți), iar modificările nivelurilor de ARNm al enzimei au fost evaluate folosind „metoda de schimbare a pliului”. În acest test, o modificare de ori mai mică de 2 ori a nivelurilor de ARNm este considerată o constatare negativă, în timp ce o modificare \geq de două ori este considerată o constatare pozitivă.

Compușii au fost testați într-un test de inducție CYP folosind hepatocite primare umane crioconservate inductibile de la trei donatori pentru a determina potențialul de a provoca inducerea (măsurată printr-o creștere a transcripției ARNm) a CYP2B6, Compușii de testare (concentrație finală de 0,12 până la 30 mM) au fost incubate timp de 48 de ore cu hepatocite umane primare care exprimă în mod natural toți receptorii nucleari implicați în reglarea nivelurilor de expresie ale diferitelor enzime CYP. Soluțiile proaspete de compuși de testare și controale au fost diluate în medii de testare și adăugate la fiecare 24 de ore timp de două zile consecutive, cu o concentrație finală de DMSO de 0,1%. La sfârșitul incubării, integritatea monostraturilor celulare, densitatea și viabilitatea celulelor au fost evaluate pentru a evalua efectele citotoxicității. Celulele au fost apoi solubilizate în tampon de liză celulară și ARN total a

fost purificat din fiecare probă de analiză. Probele au fost apoi utilizate în reacțiile în lanț de polimerază de transcripție inversă (RT-PCR) pentru a cuantifica cantitatea de specii specifice de ARNm care codifică gena CYP2B6 umană.

Potențialul de inducție al compușilor de testare și al controalelor a fost comparat cu inductorul cunoscut CYP2B6 Fenobarbital (1000 μM). Rezultatele acestui test sunt exprimate ca inducție a pliului. Inducerea pliului a fost calculată ca raport dintre nivelul ARNm din celulele tratate cu compusul de testat față de cel din celulele tratate cu DMSO (controlul solventului) singur, nivelul bazal de ARNm, și astfel reprezintă potențialul de inducție al compusului de testat. Valorile de inducție de ori au fost utilizate pentru a calcula procentul valorilor activității de control, care au fost apoi ajustate la un model de regresie logistică cu 4 parametri pentru a determina valorile EC_{50} și E_{max} (dacă s-a observat inducție). Citotoxicitatea a fost, de asemenea, evaluată în paralel pentru a evita rezultatele fals pozitive ale inducției CYP din cauza citotoxicității. Evaluarea și interpretarea potențialului de inducție a CYP la concentrații citotoxice trebuie evitate.

Rezultate:

Nu a fost observată nicio citotoxicitate cu niciunul dintre compuși la oricare dintre concentrațiile testate (până la 30 μM). Pentru Exemplu 1, o constatare negativă (fără inducție) a fost găsită la toți cei trei donatori. Pentru Exemplul 60.2, a fost găsită o constatare pozitivă (inducție) la 2 din 3 donatori (valori EC_{50} de 1,5 μM și 1,8 μM).

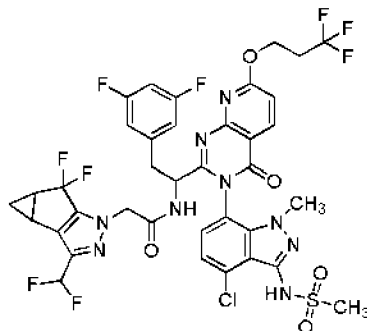
Inducerea exprimării enzimei CYP este recunoscută ca o cauză principală a interacțiunilor medicament-medicament, ceea ce duce la clearance-ul crescut al medicamentului victimă al cărui metabolism este guvernat de izoforma indusă de CYP. Dintre izoformele CYP, CYP2B6 are o importanță deosebită în contextul tratamentului HIV, deoarece efavirenz (EFV), un medicament utilizat pe scară largă pentru tratarea HIV (inclus pe lista de medicamente esențiale a Organizației Mondiale a Sănătății din 2019), este metabolizat în principal de CYP2B6 (Ward). , B. A., Gorski, J. C., Jones, D. R., Hall, S. D., Flockhard, D. A., Desta, Z. Citocromul P450 2B6 (CYP2B6) este principalul catalizator al metabolismului primar și secundar al Efavirenz: implicații pentru terapie HIV/SIDA și utilitatea terapiei Efavirenz ca marker de substrat al activității catalitice CYP2B6, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2003, 306, 287-300, DOI: 10,1124/jpet.103,049601

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2018/203235
- WO-A1-2020/157692

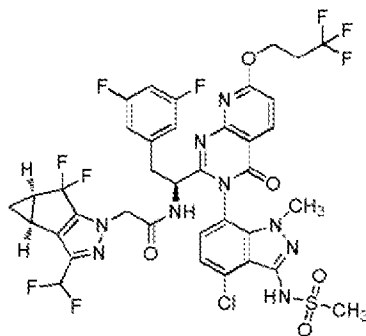
(57) Revendicări:

1. Compus:



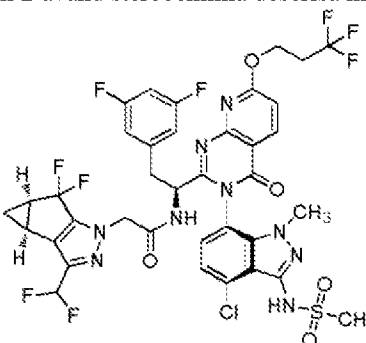
sau o sare acceptabilă farmaceutică a acestuia.

2. Compus conform revendicării 1 având stereochemia descrisă mai jos



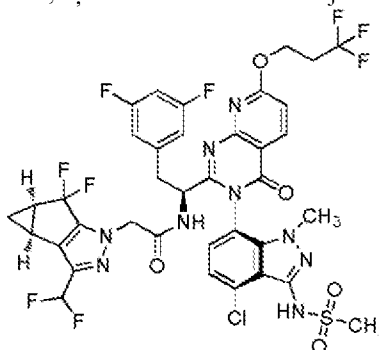
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

3. Compus conform revendicării 2 având stereochemia descrisă mai jos



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

4. Compus conform revendicării 1, așa cum este descris mai jos:



5. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic conform oricăreia dintre revendicările 1-3, care este o sare de sodiu.

6. Compoziție farmaceutică cuprinzând un compus sau sare acceptabilă farmaceutic conform oricăreia dintre revendicările 1-5.

7. Compoziție farmaceutică conform revendicării 6 cuprinzând suplimentar un excipient acceptabil farmaceutic.

8. Compoziție conform revendicării 6 sau revendicării 7 adecvată pentru administrare orală, pentru injecție intramusculară sau pentru injecție subcutanată.

9. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic conform oricăreia dintre revendicările 1-5 pentru utilizare în tratarea sau prevenirea sau reducerea riscului de infecție cu HIV la om.

10. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic pentru utilizare conform revendicării 9, în care compusul este administrat oral.

11. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic pentru utilizare conform revendicării 9, în care compusul este administrat prin injecție intramusculară sau injecție subcutanată.

12. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic pentru utilizare conform revendicării 9, în care utilizarea cuprinde în plus administrarea a cel puțin unui alt agent utilizat pentru tratamentul infecției cu HIV la om.

13. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic pentru utilizare conform revendicării 12, în care cel puțin un alt agent este selectat din grupul constând din abacavir, atazanavir, bictegravir, cabotegravir, dolutegravir, darunavir, doravirină, fostemsavir, lamivudină, maraviroc, rilpiverină, tenofovir dizoproxil, tenofovir, tenofovir afenamidă, 5-648414, GSK3640254, anticorp N6LS și GSK3739937/VH3739937.

14. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic pentru utilizare conform revendicării 13, în care cel puțin un alt agent este selectat din grupul constând din dolutegravir, lamivudină, fostemsavir, cabotegravir, anticorp N6LS și GSK3739937/VH3739937.

15. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru utilizare conform revendicării 13, în care cel puțin un alt agent este cabotegravir.

16. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru utilizare conform revendicării 13, în care cel puțin un alt agent este dolutegravir.

17. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-5 pentru utilizare în terapie.

18. Compus sau sare acceptabilă farmaceutic a acestuia conform oricăreia dintre revendicările 1-5 pentru utilizare în tratarea infecției cu HIV.

