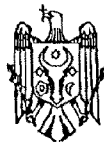




MD/EP 3347360 T2 2020.03.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3347360 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07D 495/20 (2006.01.01)
A61K 31/438 (2006.01.01)
A61P 37/00 (2006.01.01)
A61P 17/06 (2006.01.01)

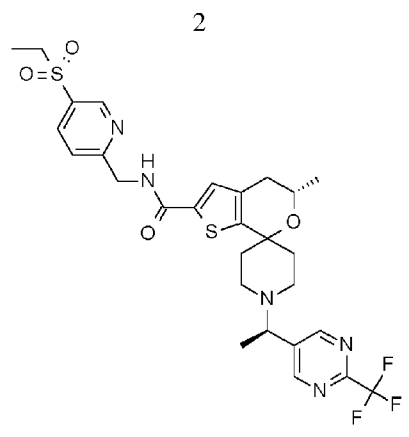
(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2018 0692	(49) Data publicării traducerii fascicului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2020, 2020.03.31
(22) Data de depozit: 2016.09.06	(80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 43/2019, 2019.10.23
(96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 16766765.8, 2016.09.06	(82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 08/2018, 2018.08.31
(97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3347360, 2019.10.23	
(31) Numărul cererii prioritare: 201562215929 P	
(32) Data de depozit a cererii prioritare: 2015.09.09	
(33) Țara cererii prioritare: US	
(71) Solicitant: Eli Lilly and Company, US	
(72) Inventator: MORPHY John Richard, US	
(73) Titular: Eli Lilly and Company, US	
(74) Mandatar autorizat: PARASCA Dumitru	

(54) Compuși utili pentru inhibarea ROR-gama-t

(57) Rezumat:

1
Prezenta invenție furnizează noi inhibitori ai ROR gama-t și compoziții farmaceutice cu aceștia.

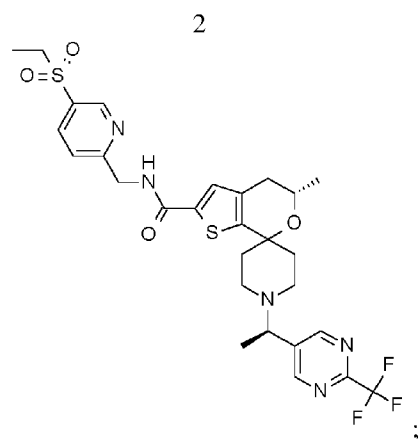


Revendicări: 9

MD/EP 3347360 T2 2020.03.31

(54) Compounds useful for inhibiting ROR-gamma-t**(57) Abstract:**

1
The present invention provides novel
ROR gamma-t inhibitors and pharmaceutical
compositions thereof:



Claims: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție se referă la compuși utili pentru inhibarea receptorului orfan gama-t asociat cu receptorul acidului retinoic (ROR γ t), la compoziții farmaceutice, și la compuși pentru

utilizare în metode pentru tratarea bolilor care au legătură cu activitatea ROR γ .
Receptorii orfani asociați receptorilor acidului retinoic (ROR) sunt membri ai superfamiliei receptorilor nucleari (NR) identificați ca regulatori patologici importanți în multe boli. Subfamilia ROR constă din ROR α , ROR β , și ROR γ . Genele ROR γ de șoarece și umane

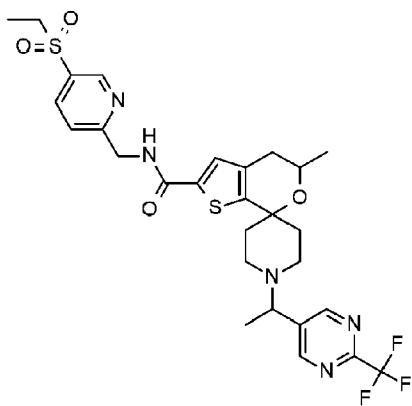
generează două izoforme, γ 1 și γ 2, cea din urmă denumită cel mai obișnuit γ t. Semnalizarea ROR γ t, adesea ca răspuns la semnalizarea IL-23/receptorului IL-23, este necesară pentru diferențierea celulelor T CD4+ naive într-un subset de celule T denumite Th17, care sunt distincte de celulele Th1 și Th2 clasice, și susțin întreținerea acestora. Celulele Th17 produc interleukină-17A (IL-17) și IL-17F. În plus, celulele Th17 produc un interval de alți factori cunoscuți pentru dirijarea răspunsurilor inflamatorii, incluzând factorul de necroză tumorală-alfa (TNF- α), interleukina-6 (IL-6), GM-CSF, CXCL1 și CCL20. Celulele NK și celulele limfoide native cum ar fi celulele similare inductorului de țesut limfoid (LTi) exprimă receptorul IL-23 și ROR γ t și produc IL-17 ca răspuns la stimulare și IL-23. Există dovada substanțială că celulele care răspund IL-23, ROR γ t, și care exprimă IL-17 sunt asociate cu bolile autoimune (AI), bolile inflamatorii, și cancerul. Astfel, inhibarea țintită a ROR γ t poate fi importantă pentru reducerea patogenezei acelor boli.

Bolile AI sunt afecțiuni cronice pentru care nu există vindecare în prezent. Tratamentul bolilor AI implică de obicei o încercare de a controla procesul bolii și de a reduce simptomele prin administrarea de medicații antiinflamatorii, antidurere, sau imunosupresive. Regretabil, utilizarea de medicații antiinflamatorii și antidurere este uneori inefficientă și utilizarea de imunosupresive conduce adesea la efecte secundare devastatoare pe termen lung. Cele mai semnificative efecte secundare ale medicamentelor imunosupresive sunt un risc crescut de infecție și un risc mai ridicat de cancer.

Au fost identificați liganzii naturali și sintetici la ROR γ t. Au fost raportați în literatură inhibitorii cu moleculă mică împotriva ROR γ t pentru AI. *Vezi* WO 2015/017335 și WO 2014/179564. Totuși, prevalența bolilor AI cuplată cu ineficacitatea sau efectele secundare devastatoare ale tratamentelor curente necesită ca mai multe opțiuni de tratament să fie disponibile pacienților. Țintirea ROR γ t poate prezenta un avantaj asupra terapiilor AI curente, maximizând beneficiul terapeutic prin țintirea celulelor imune patogene în timp ce minimizează riscul de suprimare al apărărilor gazdei.

Prezenta invenție furnizează noi compuși care sunt inhibitori ROR γ t. Astfel de noi compuși ar putea adresa necesitatea unui tratament potent, eficient al uveitei, sclerozei multiple, artritei reumatoide, bolii grefă versus gazdă, bolii Crohn, altor boli inflamatorii intestinale, cancerului, psoriazisului, și spondilartropatiilor seronegative, cum ar fi spondiloartrita axială, spondilita anchilozantă, și artrita psoriazică.

Prezenta invenție furnizează un compus cu formula



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Prezenta invenție furnizează de asemenea compuși pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul psoriazisului la un pacient, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unui compus din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia.

Mai mult, prezenta invenție furnizează compuși pentru utilizare într-o metodă pentru tratamentul spondilartropatiilor seronegative la un pacient, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta a unui compus din prezenta invenție, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia. În realizarea menționată, spondilartropatiile seronegative sunt spondiloartrita axială, spondilita anchilozantă, sau artrita psoriazică.

Prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în combinație cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. Într-o realizare suplimentară, compoziția cuprinde în plus unul sau mai mulți alți agenți terapeutici. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică pentru tratamentul psoriazisului, care cuprinde un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în combinație cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. În încă o altă realizare, prezenta invenție furnizează o compoziție farmaceutică pentru tratamentul spondilartropatiilor seronegative, care cuprind un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în combinație cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic. În realizarea menționată, spondilartropatiile seronegative sunt spondiloartrita axială, spondilita anchilozantă, sau artrita psoriazică.

Mai mult, prezenta invenție furnizează un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru tratamentul psoriazisului. Chiar mai mult, prezenta invenție furnizează un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul psoriazisului. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează utilizarea unui compus al invenției, sau a unei săruri acceptabile farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul psoriazisului.

Mai mult, prezenta invenție furnizează un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în terapie, în particular pentru tratamentul spondilartropatiilor seronegative. Chiar mai mult, prezenta invenție furnizează un compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul spondilartropatiilor seronegative. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează utilizarea unui compus al invenției, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul spondilartropatiilor seronegative. În realizările menționate, spondilartropatiile seronegative sunt de spondiloartrită axială, spondilită anchilozantă, sau artrită psoriazică.

Prezenta invenție divulgă de asemenea intermediari și procedee utile pentru sinteza unui compus din prezenta invenție.

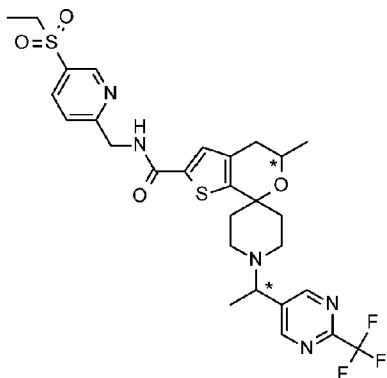
Termenul „tratarea” (sau „tratează” sau „tratament”) așa cum s-a utilizat în acest document se referă la restrângerea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom, afecțiuni sau tulburări existente.

Termenul „spondilartropatii” se referă la un număr de boli cronice ale articulațiilor care implică în general coloana vertebrală și zonele unde ligamentele și tendoanele se atașează de os. Spondilartropatiile sunt uneori denumite de asemenea spondiloartropatii sau spondiloartrite.

Termenul „seronegativ” se referă la o boală care este negativă pentru factorul reumatoid.

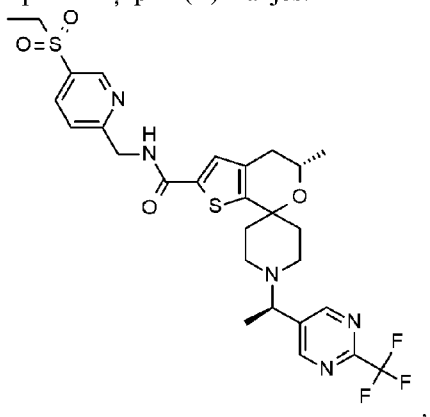
Un compus din prezenta invenție poate reacționa pentru a forma săruri acceptabile farmaceutic. Sărurile acceptabile farmaceutic și metodologia comună pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. *Vezi, de exemplu*, P. Stahl, și colab. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, ed. a 2-a revizuită (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, și colab., „Pharmaceutical Salts”, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, nr. 1, ianuarie 1977.

Specialistul calificat va aprecia că un compus al invenției, așa cum se arată în (I), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, este cuprinsul unui miez care conține cel puțin doi centri chirali, cum este reprezentat prin □ mai jos:



(I)

Deși prezenta invenție are în vedere toți enantiomerii individuali, precum și amestecuri de enantiomeri ai compușilor menționați care includ racemați, compușii preferați ai invenției sunt reprezentați prin (II) mai jos:



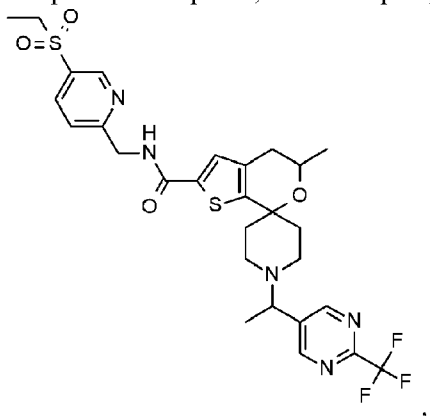
(II)

5

sau săruri acceptabile farmaceutic ale acestora.

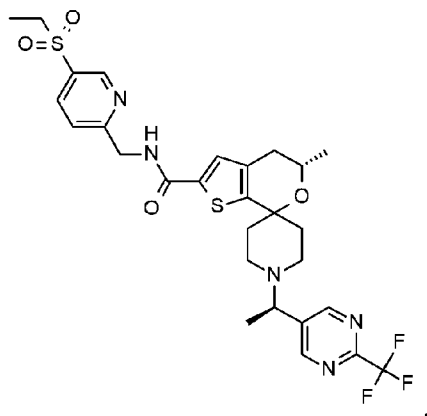
Specialistul calificat va aprecia de asemenea că denumirile Cahn-Ingold-Prelog (R) sau (S) pentru toți centrii chirali vor varia depinzând de modelele de substituție ale compusului particular. Monoenantiomerii sau diastereomerii pot fi preparați începând cu reactivii chirali sau prin tehnici sintetice stereoselective sau stereospecifice. Alternativ, monoenantiomerii sau diastereomerii pot fi izolați din amestecuri prin tehnici standard de cromatografie sau cristalizare chirală în orice punct convenabil în sinteza compușilor invenției. Monoenantiomerii compușilor invenției sunt o realizare preferată a invenției.

Un compus din prezenta invenție este preferabil formulat ca compoziții farmaceutice administrate printr-o varietate de căi. Astfel de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea acestora sunt bine cunoscute în domeniu. *Vezi, de exemplu*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, și colab., eds., a 21-a ed., Mack Publishing Co., 2005). Mai preferată în special, este o compoziție farmaceutică care cuprinde un compus cu formula,



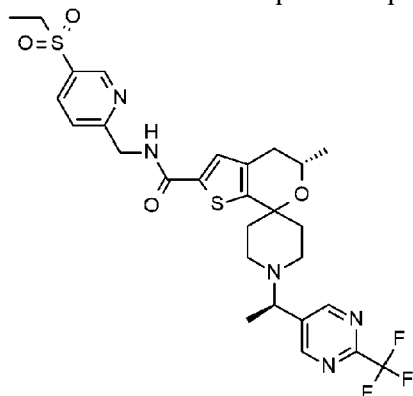
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia și unul sau mai mulți purtători sau diluanți acceptabili farmaceutic.

- O realizare preferată specială din prezenta invenție se referă la compusul, (5'S)-N-[[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil]-5'-metil-1-[(1R)-1-[2-trifluorometil]pirimidin-5-il]etil]-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamidă:



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

- O altă realizare preferată specială din prezenta invenție se referă la compusul,



- Compușii prezentei invenții sunt în general eficienți într-un interval de dozare larg. De exemplu, dozajele pe zi se situează în intervalul de la aproximativ 1 mg până la 1 g. În unele cazuri nivelurile de dozaj de sub limita inferioară a intervalului menționat mai sus pot fi mai mult decât adecvate, în timp ce în alte cazuri, pot fi utilizate doze chiar mai mari în timp ce se menține un profil beneficiu/risc favorabil, și prin urmare intervalul de dozare de mai sus nu intenționează să limiteze în nici un fel scopul invenției. Se va înțelege că va fi determinată de către un medic cantitatea compusului administrat de fapt, în lumina circumstanțelor relevante, incluzând afecțiunea care trebuie tratată, calea de administrare aleasă, compusul sau compușii efectiv administrați, vârsta, greutatea, și răspunsul pacientului individual, și severitatea simptomelor pacientului.

- Monoizomerii, enantiomerii, și diastereomerii pot fi separați sau rezolvați de cineva având calificare obișnuită în domeniu, în orice punct convenabil în sinteza compușilor cu formula I, prin metode cum ar fi tehnici de cristalizare selective sau cromatografie chirală (vezi de exemplu, J. Jacques, și colab., „Enantiomers, Racemates, and Resolutions”, John Wiley & Sons, Inc., 1981, și E.L. Eliel și S.H. Wilen”, Stereochemistry of Organic Compounds”, Wiley-Interscience, 1994). Denumiții „izomer 1” și „izomer 2” se referă la compușii care eluează din prima și respectiv a doua cromatografie chirală, și dacă cromatografia chirală este inițiată devreme în sinteză, aceeași denumire este aplicată intermediarilor și exemplurilor ulterioare.

- Suplimentar, anumiți intermediari descriși aici pot conține una sau mai multe grupări de protecție. Gruparea de protecție variabilă poate fi identică sau diferită în fiecare apariție, depinzând de condițiile de reacție particulare și de transformările particulare care urmează să fie efectuate. Condițiile de protecție și deprotecție sunt bine cunoscute specialistului calificat și sunt descrise în literatură (Vezi de exemplu „Greene's Protective Groups in Organic Synthesis”, ediția a patra, de Peter G.M. Wuts și Theodora W. Greene, John Wiley & Sons, Inc. 2007).

Anumite abrevieri sunt definite după cum urmează: „AUC” se referă la aria de sub curbă; „BSA” se referă la albumină din ser bovin; „CFA” se referă la adjuvantul lui Freund complet; „DBA” se referă la diluat maro non-Agouti; „DCM” se referă la diclorometan; „DPBS” se referă la soluție salină tamponată cu fosfat Dulbecco; „DMEM” se referă la mediul Eagle modificat Dulbecco; „DMSO” se referă la dimetil sulfoxid; „EC₅₀” se referă la concentrația efectivă la jumătatea răspunsului maxim; „EtOAc” se referă la acetat de etil; „Et₂O” se referă la etil eter; „EtOH” se referă la alcool etilic sau etanol; „ee” se referă la exces enantiomeric; „Ex” se referă la exemplu; „FBS” se referă la ser fetal bovin; „G” se referă la forța gravitațională; „GAL” se referă la domeniul de legare ADN beta-galactosidază; „GPI” se referă la glucoză -6-fosfat izomerază; „HEC” se referă la hidroxi etil celuloză; „HEK” se referă la rinichiul embrionar uman; „HEPES” se referă la acid 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetsulfonic; „IC₅₀” se referă la concentrația unui agent care produce 50% din răspunsul inhibitor maxim, posibil pentru acel agent; „IL” se referă la interleukină; „IPA” se referă la alcool izopropilic sau izopropanol; „Kd” se referă la constanta de disociere; „Ki” se referă la constanta de inhibare; „MeOH” se referă la metil alcool sau metanol; „MEM” se referă la mediul esențial minim; „PBMC” se referă la celulele mononucleare din sângele periferic; „PBS” se referă la soluție salină tamponată cu fosfat; „Prep” se referă la preparare; „RAR” se referă la receptor al acidului retinoic; și „RPMI” se referă la institutul Roswell Park Memorial. „R_t” se referă la timpul de retenție; „SCX” se referă la schimbul puternic de cationi; „SFC” se referă la cromatografia în fluid supercritic; și „THF” se referă la tetrahidrofuran.

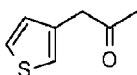
Compușii prezentei invenții, sau sărurile acestora, pot fi preparați printr-o varietate de proceduri cunoscute în domeniu, unele din acestea fiind ilustrate în preparările și exemplele de mai jos. Etapele de sinteză specifice pentru fiecare din căile descrise pot fi combinate în diferite moduri pentru a prepara compușii invenției, sau sărurile acestora. Produsele fiecărei etape de mai jos pot fi recuperate prin metode convenționale bine cunoscute în domeniu, incluzând extragerea, evaporarea, precipitarea, cromatografierea, filtrarea, triturarea, și cristalizarea. Reactivii și materiile prime sunt cu ușurință disponibile cuiva având calificare obișnuită în domeniu.

Următoarele preparări și exemple ilustrează mai departe invenția și reprezintă sinteza tipică a compușilor din prezenta invenție.

Preparări și Exemple

Preparare 1

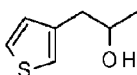
1-(3-Tienil)propan-2-onă



Se suspendă acid 2-(3-tienil)acetic (26,5 g, 146,5 mmol) în anhidridă acetică (87,9 mL, 913 mmol), și se adaugă 1-metilimidazol (7,57 g, 91,3 mmol). Se agită amestecul de reacție timp de 4 ore la temperatura camerei sub azot. Se răcește amestecul de reacție până la 0°C, se adaugă apă (150 mL), și se agită timp de 1 oră. Se diluează soluția cu EtOAc (300 mL) și se spală succesiv cu 2 M NaOH (2×200 mL), apă (200 mL) și saramură (200 mL). Se separă faza extractelor organice, se usucă pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează până la uscare pentru a obține compusul din titlu (28,16 g, 77%) ca un ulei galben. ¹H RMN (400,13 MHz, CDCl₃) δ 2,14 (s 3H), 3,7 (s, 2H), 6,94 (d, J = 5,1 Hz, 1H), 7,08 (bs, 1H), 7,29-7,26 (m, 1H).

Preparare 2

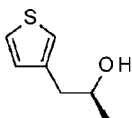
1-(3-Tienil)propan-2-ol



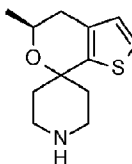
Se adaugă MeOH uscat (63 mL) la borohidru de sodiu (1,61 g, 41,67 mmol) și se răcește amestecul de reacție la -10 °C în timp ce se adaugă MeOH. Se răcește mai departe la -20°C și se adaugă o soluție de 1-(3-tienil)propan-2-onă (4,92 g, 33,34 mmol) în MeOH uscat (26,7 mL) în picătură peste 40 minute și se agită timp de 1,5 ore la -20°C, apoi la temperatura camerei timp de 17 ore. Se răcește soluția la -5°C (temperatura internă) și se stinge cu o soluție saturată de clorură de amoniu (15 mL) apoi cu HCl 1N (15 mL). Se adaugă apă (30 mL) și EtOAc (100 mL). Se concentrează amestecul sub presiune redusă până la 1/3 din volumul total. Se extrage amestecul cu EtOAc (2×100 mL). Se combină extrasele organice și se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează până la uscare pentru a da compusul din titlu (4,74 g, 100%). Spectrul de masă (m/z): 125 (M-OH+H), 164,8 (M+Na).

Preparare alternativă 2a

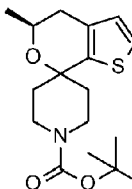
Se adaugă borohidruă de sodiu (7,06 g, 182,8 mmol) în porții în 30 minute la 0°C la o soluție de 1-(3-tienil)propan-2-onă (28,16 g, 140,6 mmol) în MeOH (282 mL) și se agită la temperatura camerei peste noapte. Se concentrează până la uscare, se diluează cu EtOAc (200 mL) și se spală cu o soluție saturată de clorură de amoniu (150 mL). Se extrage stratul apos cu EtOAc (2×200 mL). Se combină extractele organice, se usucă pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică reziduul prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu eluând cu MeOH: DCM (0:100 până la 5:95) pentru a da compusul din titlu (12,85 g, 64%) ca un ulei roșu pal. Spectrul de masă (m/z): 125 (M-OH+H).

Preparare 3**(2S)-1-(3-Tienil)propan-2-ol**

Se dizolvă 3-bromotiofenă (6,88 g, 42,2 mmol) în THF anhidru (10 mL) și toluen (100 mL). Se răcește la -78°C. La aceasta se adaugă prin seringă sec-butillitiu (1,3 mol/L în ciclohexan, 34 mL, 44 mmol) peste 15 minute. Se menține temperatura la < -60°C, se agită 10 minute, apoi se adaugă (2S)-2-metiloxiran (4,9 g, 84,4 mmol) în picătură. După 5 minute, se adaugă bor trifluorură dietil eterat (5,3 mL, 42 mmol) peste 15 minute printr-o pâlnie de picurare. Se menține temperatura la < -55°C. După ce adăugarea este completă, se agită la -78°C timp de 2 ore. Se stinge la -78°C cu bicarbonat de sodiu saturat, se adaugă Et₂O, și se încălzește la temperatura ambiantă. Se spală cu bicarbonat de sodiu saturat (2×), urmat de saramură saturată. Se usucă stratul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu, eluând cu 15% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu (3,85 g, 64,2%). Se repurifică fracțiunile amestecate pentru a da o cantitate totală a compusului din titlu (4,29 g, 71,5%) ca un lichid incolor. ¹H RMN (400,13 MHz, CDCl₃) δ 7,28-7,26 (dd, J=2,9, 5,0, 1H), 7,03-7,01 (m, 1H), 6,96 (dd, J=1,2, 4,9, 1H), 4,04-3,95 (m, 1H), 2,83-2,68 (m, 2H), 1,63 (s, 1H), 1,22 (d, J= 6,2, 3H), SAU [α]²⁰D +25,50 (c 1,00, CHCl₃).

Preparare 4**(5'S)-5'-Metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]**

Se dizolvă *terț-butil* 4-oxopiperidin-1-carboxilat (6,50 g, 32,6 mmol) și (2S)-1-(3-tienil)propan-2-ol (4,64g, 32,6 mmol) în DCM (100 mL). Se adaugă acid trifluoroacetic (20 mL, 264,5 mmol). Se agită amestecul la temperatura ambiantă 18 ore. Se concentrează amestecul sub presiune redusă, și apoi se adaugă apă și Et₂O. Se spală stratul organic cu apă, se combină spălările apoase, și apoi se ajustează pH-ul la bazic cu carbonat de sodiu solid. Se saturează stratul apos cu clorură de sodiu solidă, apoi se spală stratul apos cu EtOAc (5×). Se combină straturile de EtOAc, se spală cu saramură, se usucă cu sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (4,61g, 63%) ca un ulei galben pal. Spectrul de masă (m/z): 224,2 (M+H).

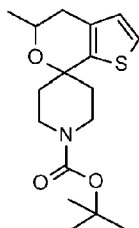
Preparare 5**(5'S)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil***

Se dizolvă (5'S)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran] (10,39 g, 46,53 mmol) în DCM (100 mL). Se adaugă di-*terț-butil* dicarbonat (11,52 mL, 51,18 mmol) în picătură și se agită amestecul la temperatura ambiantă pentru 1,5 ore. Se adaugă suplimentar di-*terț-butil* dicarbonat (2,00 mL, 9,17 mmol) și se agită 30 minute, apoi se concentrează sub presiune

redușă. Se adaugă imidazol (2,21 g, 32,5 mmol) pentru a distruge excesul de di-*terț-butil* dicarbonat (Synthesis, 2001, nr. 4, 550). Se adaugă Et₂O și se spală cu saramură. Se usucă stratul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu, eluând cu 10% EtOAc/hexani. Se repurifică prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu, eluând cu 15% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu (12,92 g, 86%) ca un ulei incolor. ¹H RMN (400,13 MHz, d₆-DMSO) δ 7,33 (d, J=5,1, 1H), 6,77 (d, J=5,1, 1H), 3,92-3,72 (m, 3H), 3,15-2,91 (s, 2H), 2,62 (dd, J=15,8, 3,0, 1H), 2,30 (dd, J=15,8, 10,6, 1H), 2,1 (m, 1H), 1,76-1,63 (m, 2H), 1,51-1,40 (m, 1H), 1,38 (s, 9H), 1,24 (d, J=6,2, 3H), 100% ee pe baza cromatografiei SFC, lux amiloză-2, 5 mL/min, 225 nm, R_t = 1,75 min, SAU [α]_D²⁰ +82,1 (c 1,00, CHCl₃).

Preparare 6

5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil*



Se adaugă acid trifluoroacetic (34,16 mL, 451,8 mmol) în picătură la 0°C la o soluție de 1-(3-tienil)propan-2-ol (12,85 g, 90,35 mmol) și *terț-butil* 4-oxopiperidin-1-carboxilat (23,40 g, 117,5 mmol) în DCM uscat (135 mL) și se menține agitarea la temperatura camerei pentru 17 ore. Se concentrează amestecul până la uscare, se diluează reziduul cu MeOH, și apoi se îndepărtează solventul sub presiune redusă. Se ia reziduul în MeOH și se purifică prin cromatografie cu schimb de ioni. Se combină straturile care conțin produsul dorit și se concentrează sub presiune redusă coevaporându-l cu toluen (3?) pentru a da un solid oranj pal de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidină] brut. Se adaugă 4-dimetilaminopiridină (2,23 g, 18,07 mmol) și trietilamină (37,8 mL, 271,1 mmol) în picătură la o soluție de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidină] (20,18 g, 90,35 mmol) în DCM uscat (90,35 mL) răcit la 0°C. La aceasta se adaugă în picătură o soluție de di-*terț-butil* dicarbonat (30,49 g, 135,5 mmol) în DCM uscat (27,1 mL). Se agită la temperatura camerei peste noapte. Se adaugă apă (100 mL), se extrage stratul apos cu DCM (3×100 mL), se spală cu saramură (100 mL), și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu, eluând cu EtOAc: izo-hexan (0:100 până la 20:80). Se coevaporează reziduul cu DCM (3×) pentru a da compusul din titlu (27,64 g, 92,7%) ca un solid alb. Spectrul de masă (m/z): 346 (M+Na)

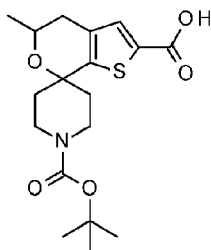
Preparare alternativă 6a

5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil*

Se adaugă acid trifluoroacetic (20,17 mL, 266,72 mmol) în picătură la 0°C la o soluție de 1-(3-tienil)propan-2-ol (4,74 g, 33,34 mmol) și *terț-butil* 4-oxopiperidin-1-carboxilat (7,80 g, 38,34 mmol) în DCM uscat (100 mL) și se agită la temperatura camerei peste noapte. Se concentrează amestecul până la uscare și se diluează reziduul cu MeOH. Se purifică materialul brut prin cromatografie cu schimb de ioni. Se combină straturile care conțin produsul dorit și se concentrează sub presiune redusă coevaporând cu DCM (3×) pentru a da 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidină] brut (8,17 g). Se adaugă 4-dimetilaminopiridină (0,831 g, 6,67 mmol) și trietilamină (9,29 mL, 66,68 mmol) la o soluție de 5-metilspiro[4,5-dihidrotieno[2,3-c]piran-7,4'-piperidină] (8,17 g) în DCM uscat (66,7 mL) răcit la 0°C. La aceasta se adaugă în picătură o soluție de di-*terț-butil* dicarbonat (18,19 g, 83,35 mmol) în DCM uscat (16,7 mL). Se agită la temperatura camerei pentru 3 zile. Se adaugă apă (60 mL), se extrage stratul apos cu DCM (3× 50 mL), se spală cu saramură (20 mL), se filtrează printr-un separator de fază, și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică reziduul prin cromatografie intermitentă pe gel de siliciu, eluând cu EtOAc: izo-hexan (0:100 până la 20:80). Se coevaporează reziduul cu DCM (2×) pentru a da compusul din titlu (9,41 g, 80%). Spectrul de masă (m/z): 346 (M+Na)

Preparare 7

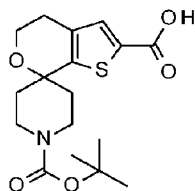
Acid 1-(*terț-butoxicarbonil*)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxilic



- Se dizolvă 5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil* (7,16 g, 21,71 mmol) în THF (108,5 mL) și se răcește la -78°C . La aceasta se adaugă butillitiu (2,5 M în hexani, 13 mL, 32,56 mmol) în picătură peste 20 minute și se agită amestecul încă 30 minute suplimentare după ce adăugarea este completă. Se barbotează în CO_2 prin canulă și se menține agitarea la această temperatură timp de 1 oră cu adăugarea continuă de CO_2 . Se permite ca reacția să se încălzească până la 0°C în 2 ore cu adăugare continuă de CO_2 și se stinge cu grijă cu apă (80 mL). Se toarnă amestecul de reacție în apă și se extrage stratul apos cu Et_2O (100 mL). Se spală faza organică cu 2 N NaOH (3×15 mL) și apă (50 mL). Se acidulează stratul apos cu 2 N HCl ($3 \times$) la pH= 6, și se extrage cu EtOAc. Se combină extractele organice și se spală cu saramură (50 mL), se usucă pe sulfat de magneziu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a obține compusul din titlu (7,89 g, 97%) ca un solid alburiu. Spectrul de masă (m/z): 390 (M+Na).

Preparare 8

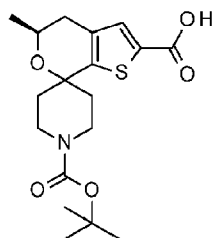
- 15 **Acid 1-(*terț-butoxycarbonil*)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxilic**



- Se dizolvă 4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil* (preparat cum s-a descris în J. Med. Chem., 2011, 54, (8), pp 2687-2700 și WO2011060035) (10 g, 32,32 mmol) în THF (100 mL) și se răcește la -78°C . La aceasta se adaugă butillitiu (22,22 mL, 35,55 mmol) în picătură peste 15 minute și se agită amestecul încă 15 minute suplimentare după ce adăugarea este completă. Se barbotează în CO_2 prin canulă și se permite ca amestecul să se încălzească la temperatura camerei cu adăugare continuă de CO_2 . După 2 ore, se răcește amestecul până la 0°C , și se adaugă apă urmată de Et_2O . Se alcalinizează stratul apos cu 1 N NaOH și se spală stratul organic cu 1 N NaOH ($3 \times$). Se combină spălările bazei și acidularea la pH 2 cu 5 N HCl. Se spală stratul apos cu EtOAc ($3 \times$), se combină extractele organice, și se spală cu saramură. Se usucă pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (11,11 g, 97,27%) ca un solid alb. Spectrul de masă (m/z): 352,2 (M-H).

Preparare 9

- 30 **Acid (5'S)-1-*terț-butoxycarbonil*-(5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxilic**

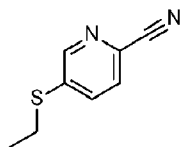


- Se dizolvă (5'S)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil* (11,19 g, 34,60 mmol) în THF anhidru (200 mL) și se răcește la -78°C . Se adaugă n-butillitiu (21 mL, 34,64 mmol) în picătură peste 20 minute. După ce adăugarea este completă, se agită la -78°C pentru 20 minute, apoi se barbotează în gaz de CO_2 prin canulă pentru 60 minute. Se încălzește amestecul la temperatura camerei cu adăugare continuă de CO_2 . După agitare 1 oră la temperatura camerei, se stinge cu apă (3 mL) și se concentrează sub presiune redusă până la 25% din volum. Se adaugă Et_2O și apă. Se spală cu apă ($2 \times$) și se combină spălările apoase. Se ajustează pH-ul la acid cu HCl 1N. Se saturează stratul apos cu clorură de sodiu și

extract cu EtOAc (2×). Se combină extractele de EtOAc, se spală cu saramură, se usucă pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (13,40 g, 100%) ca o spumă albă. Spectrul de masă (m/z): 366 (M-H).

Preparare 10

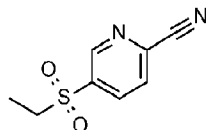
5-(Etilsulfanil)piridin-2-carbonitril



Se dizolvă 5-bromopiridin-2-carbonitril (49,42 g, 270,1 mmol) și carbonat de potasiu (113,5 g, 821,2 mmol) în 1-metil-2-pirolidinonă (280 mL) și se adaugă etantiol (26,4 mL, 356 mmol) în porții în 30 minute astfel încât temperatura să rămână sub 50°C. Se răcește reacția la temperatura camerei și se agită peste noapte. Se diluează cu EtOAc (1200 mL) și apă (2200 mL). Se colectează stratul organic și se spală cu saramură (3×300 mL), se usucă stratul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (44,87 g, 100%) ca un solid alburui. ¹H RMN (400,13 MHz, d₆-DMSO) δ 8,63 (s, 1H), 7,93 (s, 2H), 3,17 (q, J=7,3, 2H), 1,29 (t, J=7,3, 3H).

Preparare 11

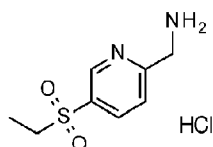
5-(Etilsulfonil)piridin-2-carbonitril



Se dizolvă 5-(etilsulfanil)piridin-2-carbonitril (44,36 g, 270,1 mmol) în DCM anhidru (540 mL) și se răcește la -20°C. Se adaugă 3-cloroperoxiacid benzoic (130 g, 565,0 mmol) în porții de 10-12 grame într-o oră, menținând temperatura internă între 0°C și -10°C. Se agită amestecul de reacție într-o baie rece, permițând să se încălzească la temperatura camerei peste noapte. Se spală cu 1 N NaOH (1 L), apă, 1 N NaOH (2×500 mL), și saramură. Se usucă stratul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (49,52 g, 93%) ca un solid alb. ¹H RMN (400,13 MHz, d₆-DMSO) δ 9,20 (d, J=1,9, 1H), 8,56 (dd, J=2,0, 8,1, 1H), 8,36 (d, J=8,1, 1H), 3,52 (q, J=7,3, 2H), 1,16 (t, J=7,5, 3H).

Preparare 12

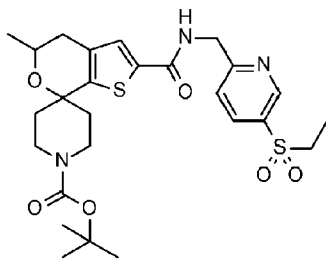
clorhidrat de 1-[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metanamină



Se divide 5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitril (49,52 g, 252,4 mmol) în trei porții de 16,5 g. Sub N₂, într-o sticlă Parr de 2250 mL, se adaugă 10% Pd/C (1,65 g, 15,5 mmol) în vas și se umezește cu MeOH (750 mL). Se adaugă la aceasta 5-(etil-sulfonil)piridin-2-carbonitril (16,5 g, 84,09 mmol) dizolvat în MeOH (750 mL). Se adaugă la aceasta HCl (6N apoasă, 17,1 mL, 102,6 mmol). Se sigilează sticla, se curăță cu N₂, se curăță cu H₂, și se presurizează până la 68,9 kPa la temperatura camerei timp de 3 ore. Se curăță cu N₂, și apoi se filtrează amestecul. Se repetă cu porțiile rămase de 5-(etilsulfonil)piridin-2-carbonitril. Se combină toate filtratele și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (59,61 g, 99%) ca un bej solid. Spectrul de masă (m/z): 201 (M+H-HCl).

Preparare 13

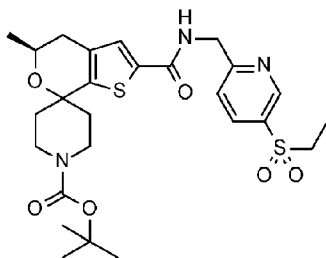
2'-([5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil)carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-1-carboxilat de *terț*-butil



Se dizolvă acid 1-[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metanamină clorhidrat (3,1 g, 13 mmol), 1-(*terț-butoxicarbonil*)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxilic (3,9 g, 10 mmol) în DCM anhidru (52 mL). Se răcește la 0°C și se adaugă trimetilamină (10 mL, 73 mmol) în picătură urmată de 1,67 M soluție de 2,4,6-tripropil-1,3,4,2,4,6-trioxatrifosforinan-2,4,6-trioxid (8,6 g, 14 mmol) în EtOAc. Se permite ca amestecul să se încălzească la temperatura camerei și se agită peste noapte. Se adaugă cu grijă apă (50 mL) și se agită 10 minute la temperatura camerei. Se extrage stratul apos cu DCM (2×), apoi se combină extractele organice. Se spală extractele organice cu saramură, se usucă pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă. Se purifică materialul brut prin cromatografie pe gel de siliciu, eluând cu un gradient de 50% până la 100% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu (4,89 g, 83%) ca o spumă galbenă. Spectrul de masă (m/z): 550 (M+H).

Preparare 14

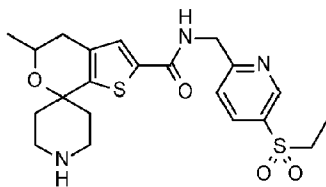
(5'S)-2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil*



Se dizolvă clorhidrat de 1-[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metanamină (2,86 g, 10,5 mmol), acid (5'S)-1-*terț-butoxicarbonil*-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxilic (3,50 g, 9,52 mmol), și 1-hidroxibenzotriazol (1,44 g, 10,5 mmol) în THF anhidru (100 mL) și dimetilformamidă (50 mL). Se adaugă N,N-diizopropiletilamină (4,98 mL, 28,6 mmol) urmată de clorhidrat de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimidă și se lasă să se agite la temperatura camerei peste noapte. Se concentrează sub presiune redusă la □40% din volum, apoi se adaugă EtOAc. Se spală cu bicarbonat de sodiu saturat (2×), apă (2×), saramură (2×), se usucă stratul organic peste sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă. Se cromatografiază pe gel de siliciu cu 80% EtOAc/hexani pentru a da compusul din titlu (4,51 g, 86%) ca o spumă gri. Spectrul de masă (m/z): 550 (M+H).

Preparare 15

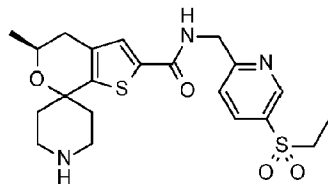
Diclorhidrat de N-({[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxamidă



Se dizolvă 2'-({[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat de *terț-butil* (0,95 g, 1,68 mmol) în MeOH (10 mL) și se adaugă 4 M HCl în dioxan (4,5 mL, 18 mmol). Se agită la temperatura camerei timp de 1 oră, apoi se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (0,86 g, 100%) ca un solid alb. Spectrul de masă (m/z): 450 (M+H-2HCl).

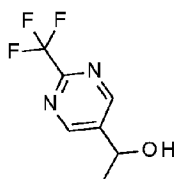
Preparare 16

Diclorhidrat de (5'S)-N-({[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxamidă

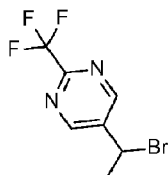


2 HCl

Se dizolvă (5'S)-2'-([5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}carbamoil)-5'-metil-4',5'-dihidro-1H-spiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-1-carboxilat *terț-butil* mmol (1,14 g, 2,0 mmol) în 1,4 dioxan (10 mL) și MeOH (5 mL). Se adaugă 4 M HCl în dioxan (5,0 mL, 20 mmol) și se agită la temperatura camerei timp de 2 ore. Se concentrează până la aproximativ 10 mL, apoi se adaugă Et₂O și se agită viguros peste noapte. Se adaugă hexani, se filtrează, și se clătește cu hexani pentru a da compusul din titlu (0,99 g, 91%) ca un solid galben deschis. Spectrul de masă (m/z): 450 (M+H-2HCl).

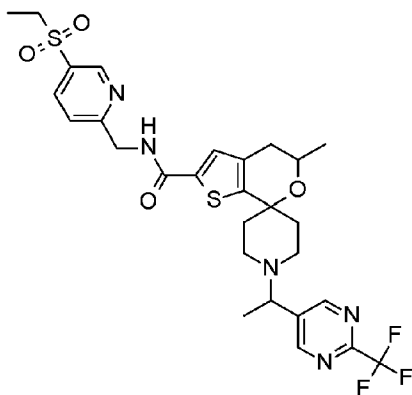
Preparare 17**1-[2-(Trifluorometil)pirimidin-5-il]etanol**

Se dizolvă 2-(trifluorometil)pirimidin-5-carbaldehidă (11,31 mmol, 1,992 g) în THF (56,56 mL), se răcește la 0°C, și se adaugă încet bromură de metilmagneziu (3 M în Et₂O) (33,94 mmol, 11,31 mL). Se permite ca reacția să se încălzească la temperatura camerei și se agită 2,5 ore. Se stinge reacția cu HCl 1N. Se adaugă EtOAc și se spală cu HCl 1N. Se usucă organicele pe sulfat de sodiu, se filtrează, și se concentrează sub presiune redusă pentru a da compusul din titlu (1,663g, 76,5%). Spectrul de masă (m/z): 193,0 (M+H).

Preparare 18**5-(1-Bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidină**

Se dizolvă 1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etanol (8,655 mmol, 1,663 g) și trifenilfosfină (12,98 mmol, 3,405 g) în DCM (86,55 mL) și se adaugă N-bromo-succinimidă (12,98 mmol, 2,311 g) la temperatura camerei. După trei ore, se concentrează reacția sub presiune redusă. Se purifică reziduul rezultat prin cromatografie pe gel de siliciu, eluând cu 10% EtOAc / hexani pentru a da compusul din titlu (1,641 g, 74,34%). ¹H RMN (400,13 MHz, d₆-DMSO) δ 9,26 (s, 2H), 5,63 (q, J = 7,0 Hz, 1H), 2,09 (d, J = 7,0 Hz, 3H).

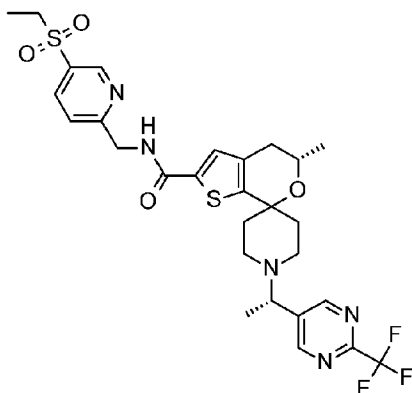
Exemplul 1**N-([5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil)-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă**



Se dizolvă diclorhidrat de N-([5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil)-5'-metil-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamidă (1,12 g, 2,31 mmol) în acetonitril (11,6 mL) și diizopropiletilamină (2,42 mL, 13,9 mmol) și se adaugă 5-(1-bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidină (0,71 g, 2,77 mmol). Se încălzește amestecul la 60°C timp de 90 de minute, apoi se răcește la temperatura ambiantă și se concentrează sub presiune redusă. Se dizolvă amestecul brut în MeOH (5 mL), apoi se încarcă pe o coloană de 50 g SCX. Se colorează cu MeOH (150 mL) și apoi se eluează produsul cu 2 N amoniac/MeOH (150 mL). Se concentrează spălările cu amoniac/MeOH sub presiune redusă la o spumă portocalie. Se cromatografiază materialul brut prin cromatografie pe gel de siliciu, eluând cu un gradient de 100% DCM până la 95% DCM/MeOH pentru a da compusul din titlu (1,54 g, 43%). Spectrul de masă (m/z): 624 (M+H).

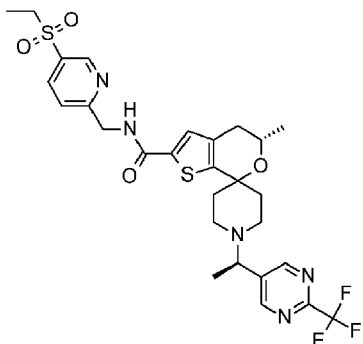
Exemplul 2

(5S')-N-([5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil)-5'-metil-1-((1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă



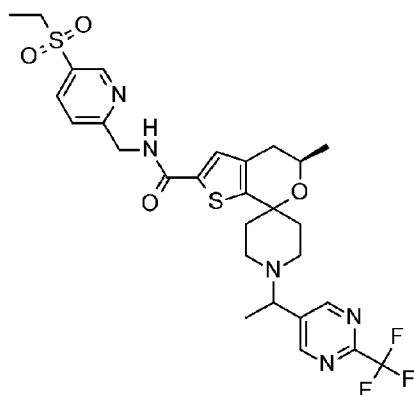
Exemplul 3

(5S')-N-([5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil)-5'-metil-1-((1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă



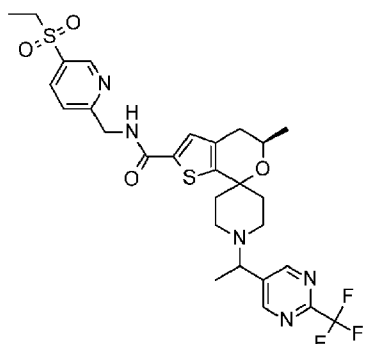
Exemplul 4

Izomer 1 (5R')-N-([5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil)-5'-metil-1-([1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă

**Exemplel 5**

Izomer 2 (5R')-N-{{[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă

5

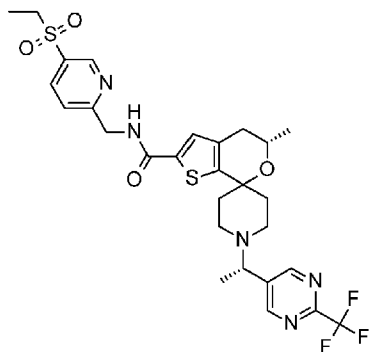


Se dizolvă N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă (1,28 g, 2,05 mmol) în MeOH (58,5 mL). Se separă prin cromatografie chirală prin coloană SFC [AD-IC (30 x 250 mm, 5 μ) și se eluează cu 50% IPA (20 mM NH₃) la 120 mL/minut cu o injecție de 4,5 mL (200 mg) la fiecare 10 minute pentru a da Exemplel 5, izomer 2 (5R')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă și se amestecă fracțiunile care conțin Exemplel 2, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă, Exemplel 3, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă și Exemplel 4, izomer 1 (5R')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă. Se concentrează fracțiunile amestecate și se dizolvă acestea în MeOH (55,5 mL). Se separă amestecul prin cromatografie chirală prin coloană SFC [OJ-H (30 x 250 mm, 5 μ) și se eluează cu 22% MeOH (20 mM NH₃) la 160 mL/minut, cu o injecție de 5,0 mL la fiecare 5 minute pentru a da Exemplel 4, izomer 1 (5R')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă și un amestec din Exemplel 3, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă și Exemplel 2, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă. Se concentrează fracțiunile amestecate și se dizolvă acestea în MeOH (30,0 mL). Se separă amestecul prin cromatografie chirală prin coloană SFC [AD-H (50 x 250 mm, 5 μ) și se eluează cu 50% IPA (20 mM NH₃) la 200 mL/min, cu injecție de 3,0 mL la fiecare 32 minute pentru a da Exemplel 2, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1S)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă și Exemplel 3, (5S')-N-{{[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-{(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil}-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă. Se concentrează fiecare set de fracțiuni pure, apoi se dizolvă produsele separate în acetonitril (0,6 mL), se adaugă apă, se congelează la -78°C, și se liofilizează pentru a da Exemplel 2, 0,214 g, 16%, 99,5% ee, R_t = 2,94 minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H). Exemplel 3, 0,203 g, 15%, 98,9% ee, R_t = 2,75 minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H). Exemplel 4, 0,251 g, 17%, 98,3% ee, R_t = 4,75

minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H). Exemplul 5, 0,272 g, 18%, 100% ee, $R_t = 4,33$ minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H). Condiții analitice: SFC (220 nm UV), coloană: AD-IC 30 x 250 mm, 5 μ , fază mobilă: 50% IPA (20 mM NH_3). Condiții analitice LC chirale: SFC (225 nm UV), coloană Chirocel OJ-H, 20% MeOH (0,2% izopropilamină)/ CO_2 , 5 mL/min.

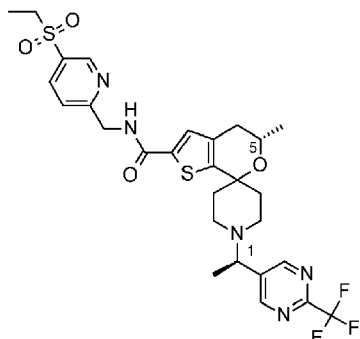
5 **Preparare alternativă a Exemplului 2**

(5S')-N-[[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil]-5'-metil-1-((1S)-1-[2-(trifluorometil)piri-midin-5-il]etil)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă



10 **și Preparare alternativă a Exemplului 3**

(5S')-N-[[5-(Etilsulfonil)piridin-2-il]metil]-5'-metil-1-((1R)-1-[2-(trifluorometil)piri-midin-5-il]etil)-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'tieno[2,3-C]piran]-2'-carboxamidă



15 Se dizolvă diclorhidrat de (5S')-N-[[5-(etilsulfonil)piridin-2-il]metil]-5'-metil-4',5',dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3,c]piran]-2'-carboxamidă (28,28 g, 58,19 mmol) în acetonitril (280 mL) și diizopropiletilamină (50 mL, 290,9 mmol) și se adaugă 5-(1-bromoetil)-2-(trifluorometil)pirimidină (0,71 g, 2,77 mmol), apoi se agită la temperatura ambiantă peste noapte. Se concentrează sub presiune redusă, apoi se dizolvă amestecul brut în DCM și se purifică cu
20 cromatografie pe gel de siliciu eluand cu 100% EtOAc pentru a da amestecul de compuși din titlu. Se separă prin cromatografie chirală cu coloană [Chiralpak IA (8 x 40,5 cm, 225 nm)] și se eluează cu 40% acetonitril/60% izopropilalcool (cu 0,2% dimetiletilamină) la 400 mL/minut, cu injecție de 20 mL (2000 mg). Se concentrează fiecare diastereomer sub presiune redusă, apoi se dizolvă în etanol fierbinte (250 mL), se filtrează fierbinte, apoi se lasă să se răcească la temperatura
25 ambiantă, și se clătește cu etanol rece. Solidul se usucă într-un cuptor cu vid la 55°C pentru a da Exemplul 2, 9,94 g, 27%, 90,8 % ee, $R_t = 3,93$ minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H) și Exemplul 3, 9,42 g, 26%, 98,8% ee, $R_t = 9,25$ minute, spectrul de masă (m/z): 624 (M+H)) ca material cristalin. Condiții analitice: Coloană Chiralpak IA (4,6 x 150 mm, 225 nm) și se eluează cu 40% acetonitril/60% izopropilalcool (cu 0,2% dimetiletilamină) la 1 mL/minut.

30 **Difracție cu raze X, Exemplul 3**

Se montează un singur cristal pe o fibră subțire MiTeGen la 23°C. Se colectează datele utilizând o sursă de radiație CuK_α ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) și un Bruker D8 pe bază de difractometru goniometru cu 3 cercuri, echipat cu un detector de zonă SMART 6000CCD (Bruker-AXS. SHELXTL (V2013 6,2) Madison, Wisconsin, SUA). Se efectuează rafinarea celulei și reducerea
35 datelor utilizand programul SAINT V8.32b (Sheldrick, G.M., (2008), SHELXS-97, Acta Cryst. A64, 112-122). Se indexează celula unitară care are parametri monoclinici de $a = 10,1624(2) \text{ \AA}$, $b = 9,9080(2) \text{ \AA}$, $c = 15,1085(3) \text{ \AA}$, și $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 100,6879(14)^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. Volumul celulei de structură cristalină este $1494,87(5) \text{ \AA}^3$. Densitatea calculată a structurii este $1,386 \text{ g/cm}^3$ la 23°C. Se rezolvă structura prin metode directe (Sheldrick, G.M., (2008), SHELXS-97, Acta Cryst. A64, 112-122). Toți parametrii atomici au fost rafinați în mod independent. Alegerea grupului spațial,

care este P₂₁, este confirmată prin convergența cu succes a întregii matrice a celor mai mici pătrate, rafinate pe F² (Sheldrick, G. M., (2013), SHELXL-2013, Program pentru rafinamentul structurii cristaline, (Institute fur anorg chemie, Gottingen, Germania) cu o acceptanță finală de corespondență de 1,088. Factorul rezidual final, R₁, este = 0,0771 și cea mai mare diferență între maxim și minim după ciclul de rafinament final a fost de 0,315 și respectiv de -0,333 (e.A-3). Parametrul structurii absolute a fost rafinat până la 0,072(17).

Structura din Exemplul 3 este determinată și structura moleculară este consistentă cu cea prezentată pentru Exemplul 3. Ar trebui să se observe că structura cristalului este de calitate ridicată și stabilește stereochimia absolută a centrilor chirali din Exemplul 3, C5 ca (S) și C1 ca (R) din gruparea piperdină prin utilizarea contribuției anormale de împrăștiere a atomilor grei (sulf) în structură. Configurația absolută este determinată din structura cristalină pentru a fi configurația (5'S)-N-{{[5-(etilulfonil)piridin-2-il]metil}-5'-metil-1-[(1R)-1-[2-(trifluorometil)pirimidin-5-il]etil]-4',5'-dihidrospiro[piperidin-4,7'-tieno[2,3-c]piran]-2'-carboxamidei.

Teste biologice

Inhibitori de legare RORa, b, și g

Receptorul orfan alfa asociat cu RAR uman etichetat His (hRORa), receptorul orfan beta asociat cu RAR uman (hRORb), și receptorul orfan gama asociat cu RAR uman (hRORg) sunt utilizați pentru testele de legare competiționale receptor-ligand, pentru a determina valorile K_i. Procedurile tipice sunt furnizate mai jos.

Testele de legare competiționale ale receptorilor sunt rulate într-un tampon realizat din DPBS (1 L) (Hyclone #SH30028,03), fracțiunea 2,2 g BSA v (Roche #9048-46-8), 100 mL glicerol (Fischer #56-81-5) și 40 mL DMSO (grad reactiv). Godeurile finale conțin 20 μg/mL aprotinin și 20 μg/mL leupeptin și 10 μM Pefabloc. De obicei, testele de legare ale receptorilor includ liganzi etichetați radio, cum ar fi 7 nM [³H]-25-hidroxicolesterol pentru legare alfa, 20 nM [³H]-3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-izopropil-izoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]acid benzoic pentru legare beta, și 6 nM [³H]-25-hidroxicolesterol pentru legare gama, și 0,5 μg receptor RORa, 0,03 μg receptor RORb, sau 0,13 μg receptor RORg pe godeu. Testele sunt de obicei rulate în format cu 96 de godeuri. Compușii competiționali testați se adaugă în diferite concentrații care variază de la aproximativ 0,4 nM până la 25 μM. Legarea nespecifică este determinată în prezența a 250 nM 25-hidroxicolesterol pentru legarea RORa și RORg, 250 nM acid 3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-izopropil-izoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]benzoic pentru legarea RORb. Mostra, eticheta și soluțiile receptor sunt combinate într-o placă de test cu 96 de godeuri (Costar 3632) și incubate peste noapte la temperatura camerei, apoi se adaugă la fiecare reacție 25 μl perle (Amersham YSi (2-5 micron) de cupru Spa Beads etichetate His, #RPNQ0096) pentru o concentrație de perle finală de 1 mg/godeu. Plăcile sunt amestecate timp de 30 minute pe un agitator orbital la temperatura camerei. După o incubare de 4 ore, plăcile sunt citite într-un numărator Wallac MICROBETA®.

Datele sunt utilizate pentru a calcula o valoare IC₅₀ estimată utilizând o corespondență logistică cu patru parametri. K_d pentru acidul [³H]-25-hidroxicolesterol pentru RORa și RORg, și [³H]-3-[[4-[[3-(2,6-diclorofenil)-5-izopropil-izoxazol-4-il]metoxi]-N,2-dimetil-anilino]metil]benzoic pentru legarea RORb, este determinată prin legarea de saturație. Valorile IC₅₀ pentru compuși sunt convertite la K_i utilizând ecuația Cheng-Prushoff.

Rezultatele următorilor compuși exemplificați sunt prezentate în Tabelul 2 mai jos.

Tabelul 2

# Exemplu	K _i a RORa (nM)	K _i a RORb (nM)	K _i a RORg (nM)
1	>20,400	>12500	12,0 ± 7,3, n=2
2	>20,400	>12500	6,24 ± 0,73, n=2
3	>20,400	>12500	16,6 ± 8,8, n=5
4	>20,400	2190	148 ± 40, n=2
5	>20,400	407	153 ± 25, n=2
Medie ± SEM; SEM = eroare standard a mediei			

Aceste rezultate demonstrează că compușii din Tabelul 2 sunt selectivi pentru RORg versus RORa și RORb.

Test receptor-reporter HEK293 RORg GAL4

Ca un indicator al activității agoniste inverse, un test receptor reporter (RORg-GAL4/pGL4,31) al receptorului orfan gama asociat cu RAR (RORg) este efectuat în celule HEK293. Celulele HEK293 sunt cotransfectate utilizând reactivul Eugene™. O plasmidă reporter

- care conține un domeniu de legare GAL4 și un promotor adenoviral minimal în amonte de o genă luciferază licurici, este cotransfectată cu o plasmidă care exprimă constitutiv un domeniu de legare al ligandului ROR γ uman fuzionat la domeniul de legare ADN GAL4 al drojdiei. Celulele sunt transfectate în flacoane T150 cm² în mediu MEM fără FBS. După 18 ore de incubare, celulele transfectate sunt tripsinizate, placcate în 9 plăci cu 6 godeuri de microtitrare în mediu 3:1 DMEM-F12 care conține 10% FBS, incubate pentru 4 ore și apoi expuse la diferite concentrații ale compușilor testați care variază de la aproximativ 0,05 nM până la 10 μ M. După 18 ore de incubare cu compuși, celulele sunt lizate și activitatea luciferază este cuantificată utilizând tehnici standard. Datele sunt potrivite cu o logistică de corespondență cu 4 parametri pentru a determina valorile IC₅₀.

Rezultatele următorilor compuși exemplificați sunt prezentate în Tabelul 3 mai jos.

Tabelul 3

# Exemplu	hIC ₅₀ (nM)
1	56,5 $\pm$ 39,4, n=2
2	45,8 $\pm$ 8,5, n=4
3	21,8 $\pm$ 7,03, n=7
4	97,9 $\pm$ 5,1, n=2
5	59,5 $\pm$ 1,3, n=2
Medie $\pm$ SEM; SEM = eroare standard a mediei	

15

Aceste rezultate demonstrează că compușii din Tabelul 3 sunt agoniști inverși pentru receptorul ROR γ uman.

Test de viabilitate ELISA și Cell TiterGlo pentru secreția de PBMC IL-17

- Celule PBMC sunt izolate din straturile tampon de sange integral prin combinarea mai întâi a straturilor tampon proaspete cu volume egale de soluție salină tamponată cu fosfat. Treizeci și cinci mL de PBS/soluție de strat tamponat sunt apoi ușor suprapuse pe 15 mL de Ficoll în tuburi conice de 50 mL. După centrifugare timp de 30 minute la 500 $\times$ g (cu accelerare și decelerare lentă) stratul superior de plasmă este eliminat și stratul celulelor de-a lungul interfeței Ficoll este colectat și unificat. Fiecare tub de 250 mL este umplut până la vârf cu mediu RPMI-1640 la temperatura camerei. Tuburile sunt centrifugate pentru 10 minute la 500 $\times$ G (cu accelerare și decelerare lentă), mediul este îndepărtat prin aspirare, și etapa de spălare este repetată. Celulele sunt resuspendate în mediu Recovery Cell Culture Freezing de gheață rece de la Life Technologies (număr de catalog 12648-010) pe gheață. Concentrația de celule este ajustată până la 66,7 milioane celule/mL. Celulele sunt congelate lent la -1°C/minut în fiole cu 100 milioane de celule și depozitate în azot lichid.

25

Stimulare de secreție IL-17 și adăugarea compusului

- PBMC sunt dezghețate prin resuspendare cu 1 mL de mediu complet (RPMI-1640 care conține 30 mM HEPES, 100 unități/mL penicilină, 100 μ g/mL streptomycină, 3,25 mM L-Glutamină, 0,2 μ M beta-mercaptoetanol, și 10% FBS) urmată de adăugarea în picătură a 2 mL, 4 mL, 8 mL, și 16 mL de mediu complet cu răsucire ușoară. Celulele sunt centrifugate 5 minute și peletul celular este resuspendat în mediu complet. Grupuri de celule sunt rupte prin rularea soluției celulare printr-o seringă cu ac de calibru 23, și un filtru celular de 40 μ M. Se adaugă o sută de mii de celule pe godeu la o cultură de țesut de polistiren cu 384 godeuri, tratată cu plăci cu fund plat într-un total de 30 μ L. Cocktailul de stimulare care conține anticorpi CD3 anti-umani, anticorpi CD28 anti-umani, IL-23 și compuși preparați în mediu complet, se adaugă la celule simultan într-un volum total de 30 μ L. Concentrația finală de stimulanți adăugați este de 160 ng/mL, 500 ng/mL, și 5 ng/mL pentru anticorpii anti-CD3, anticorpii anti-CD28, și respectiv IL-23 și de 0,3% pentru DMSO. Plăcile sunt etanșate cu film de etanșare AERASEAL® și incubate 48 ore la 37°C, 95% umiditate, și 5% CO₂.

35

- După perioada de incubare, plăcile sunt centrifugate la 200 $\times$ g cinci minute. Supernatanții sunt diluați 1:1 cu volum egal 1% BSA/PBS și testați pentru IL-17 cu o trusă ELISA IL-17 umană de la R&D System (catalog #D317E) în conformitate cu protocolul furnizat cu trusa, cu o excepție - este utilizat substratul colorimetric OPD (diclorhidrat o-fenilenediamină, Sigma Cat #P6912) în locul unui substrat furnizat în trusă. Absorbanța la 492 nm este măsurată cu cititorul de placă multi-etichetă Envision. Valorile A492 sunt convertite în concentrație de IL-17 pe baza curbei standard IL-17, așa cum se arată mai jos:

50

$$\text{pg/mL IL-17} = \text{EC}_{50} * [(\text{Top-Bottom}) / (\text{A}_{492}\text{-Bottom}) - 1] / (1/\text{Hill}).$$

Valorile IC₅₀ pentru inhibarea secreției de IL-17 sunt calculate pe baza valorilor convertite utilizând o corespondență standard cu 4 parametri, cu inhibarea maximă determinată din valorile

medii ale godeurilor fără stimulanți și compuși adăugați, și inhibarea minimă din valorile medii ale godeurilor cu stimulanți singuri și fără compuși adăugați.

- 5 Volume egale de reactiv de testare a viabilității celulare Cell TITERGLO® (Promega Cat# G7573) se adaugă la celulele rămase pe plăci, și după o incubare de cincisprezece minute cu agitare ușoară la temperatura camerei, luminiscenta este măsurată cu cititorul de placă multietichetă Envision. Procentajul de moarte celulară este calculat prin setarea activității 100% (moarte celulară) la zero unități de luminiscentă și activitate minimă (număr max de celule viabile) ca media unităților de luminiscentă ale godeurilor care conțin stimulanți singuri și nu au compuși adăugați. Valorile IC₅₀ sunt calculate utilizând o corespondență standard cu patru parametri.
- 10 Rezultatele următorilor compuși exemplificați sunt prezentate în Tabelul 4 mai jos.

Tabelul 4

# Exemplu	ELISA hPBMC IL-17 (nM)	Viabilitate Cell TiterGlo (EC ₅₀)
1	77,3	>1,0 μM
2	33,7 ± 33,1, n=6	>1,0 μM
3	20,0 ± 12,6, n=12	>1,0 μM
4	106	>1,0 μM
5	30,5 ± 29,3, n=4	>1,0 μM
Medie ± SEM; SEM = eroare standard a mediei		

- 15 Aceste rezultate arată că compușii din Tabelul 4 inhibă secreția de IL-17 stimulată de anti-CD3/anti-CD28/IL-23 în PBMC-uri fără efect citotoxic măsurabil.

Model de artrită indusă de glucoză-6-fosfat izomerază (GPI):

- Modelul de artrită indusă GPI este adaptat de la K. Iwanami și colab. Arthritis Rheumatism 58, 754-763, 2008 și D. Schubert și colab. J Immunology 172, 4503-4509, 2004.
- 20 Șoarecii (șoareci DBA/1 masculi cu vârsta de 8-9 săptămâni) (Harlan) sunt repartizați aleator în grupuri de tratament pe baza greutateii corporale colectate pe zi de imunizare (ziua 0). Pe zi de imunizare (ziua 0), un amestec 1:1 (v:v) de GPI uman recombinant (dilat până la 4 mg/mL în PBS, Gibco) și de adjuvant Freund complet (CFA, Sigma) este amestecat cu un omogenizator de mare viteză (Omni) pentru 40 minute într-o cameră rece. O concentrație finală de 2 mg/mL GPI
- 25 este obținută în emulsie. Șoarecii sunt injectați la baza cozii (2 situsuri de injecție, subcutanate, 100 μL pe fiecare situs) cu emulsie GPI. Compușii testați sunt dozați oral începând în aceeași zi cu imunizarea (ziua 0). Începând cu ziua 0, fiecare labă este notată pentru severitatea umflării articulației pe baza unui sistem de notare de la 0 până la 3 (Vezi K. Iwanami și colab. Arthritis Rheumatism 58, 754-763, 2008). Scorurile clinice reprezintă scorul total al tuturor celor 4 labe (scor maxim = 12). Scorurile clinice sunt evaluate pe zile 0, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, și
- 30 21.

AUC este calculată printr-o metodă trapezoidă pentru scorul clinic în timp, din ziua de imunizare (ziua 0) până în ziua 21. Valorile p testate au fost derivate din testul t Student.

- 35 Tratamentele cu Exemplul 3 (1000 mg/Kg) și vehicul (1% HEC, 0,25% Polisorbit 80, și 0,05% Antifoam în apă purificată) (n=8/grup) sunt inițiate în ziua 0 și administrate oral, o dată zilnic. Exemplul 3 reduce severitatea umflării labei și menține mai scăzută media scorurilor clinice prin cursul bolii, în comparație cu grupul tratat cu vehicul. Acest efect conduce la 75% reducere în scorul clinic AUC, o măsură cumulativă a umflării labei în timp, care este statistic semnificativă în comparație cu grupul tratat cu vehicul așa cum se arată în Tabelul 5.

40

Tabelul 5

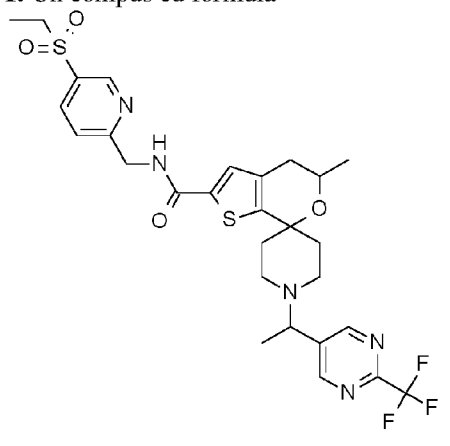
Tratament	Scor clinic AUC (medie ± SEM)
Vehicul	87,70 ± 4,88
Exemplul 3	22,20 ± 8,68*
Valorile sunt prezentate ca medie ± SEM. *p<0,05 vs. vehicul (test t Student). SEM = eroare standard a mediei	

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-2015/101928

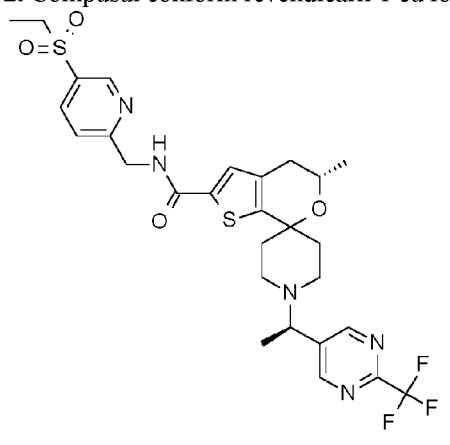
(57) Revendicări:

1. Un compus cu formula



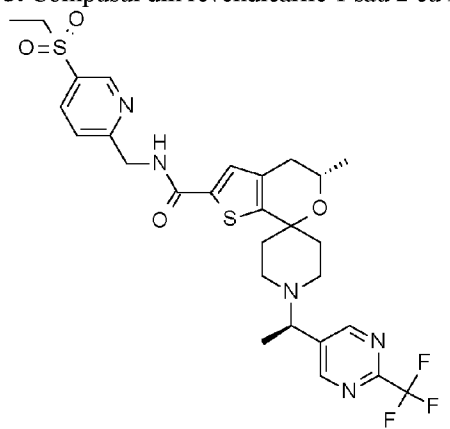
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

2. Compusul conform revendicării 1 cu formula



sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

3. Compusul din revendicările 1 sau 2 cu formula



4. O compoziție farmaceutică cuprinzând un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, în combinație cu unul sau mai mulți purtători, diluanți, sau excipienți acceptabili farmaceutic.

5. Compoziția farmaceutică în conformitate cu revendicarea 4 care cuprinde unul sau mai mulți alți agenți terapeutici.

6. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în terapie.

7. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul psoriazisului.

8. Un compus conform oricăreia dintre revendicările 1 până la 3, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul spondilartropatiilor seronegative.

9. Un compus, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în conformitate cu revendicarea 8 în tratamentul spondiloartritei axiale, spondilitei anchilozante, sau artritei psoriazice.