

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 268**

51 Int. Cl.:

C07D 401/14 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/US2013/044800**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13185084**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13800042 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2858499**

54 Título: **Inhibidores de pirimidinil tirosina quinasa**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657360 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.10.2018

73 Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (50.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US y
SUNESIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOPKINS, BRIAN T.;
CONLON, PATRICK;
CHAN, TIMOTHY R.;
JENKINS, TRACY J.;
CAI, XIONGWEI;
HUMORA, MICHAEL;
SHI, XIANGLIN;
MILLER, ROSS A. y
THOMPSON, ANDREW**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 684 268 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de pirimidinil tirosina quinasa

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad para la solicitud provisional de EE. UU. con número de serie 61/657,360, presentada el 8 de junio de 2012.

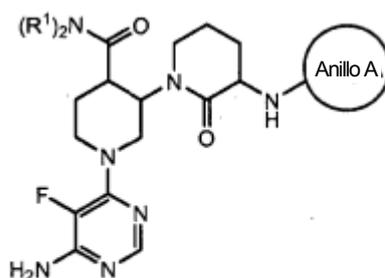
10 Antecedentes de la invención

Las Tec quinasas son tirosina quinasas no receptoras que incluyen: Tec (tirosina quinasa expresada en carcinoma hepatocelular), Btk (tirosina quinasa de Bruton), Itk (quinasa de células T inducible por interleucina-2 (IL-2); conocida además como Emt o Tsk), Rlk (quinasa de linfocitos en reposo; conocida además como Txk), Lck (proteína tirosina quinasa específica de linfocitos) y Bmx (gen de tirosina quinasa de la médula ósea en el cromosoma X; conocida además como Etk). Estas quinasas se expresan principalmente en células hematopoyéticas, aunque la expresión de Bmx y Tec se ha detectado en células endoteliales y hepáticas. Las Tec quinasas (Itk, Rlk y Tec) se expresan en células T y todas se activan en la vía descendente del receptor de células T (TCR). Btk es un mediador en la vía descendente de la señalización del receptor de células B (BCR) que está implicado en la regulación de la activación, proliferación y diferenciación de células B. Más específicamente, Btk contiene un dominio PH que se une al fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). La unión a PIP3 induce que Btk fosforile la fosfolipasa C (PLC γ), que a su vez hidroliza PIP2 para producir dos mensajeros secundarios, inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que activan la proteína quinasa PKC, que después induce una señalización adicional de las células B. Las mutaciones que inactivan la actividad enzimática de Btk dan como resultado el síndrome de XLA (agammaglobulinemia ligada al cromosoma X), una inmunodeficiencia primaria. Dados los roles críticos que las Tec quinasas juegan tanto en la señalización de células B como de células T, las Tec quinasas son objetivos de interés para los trastornos autoinmunitarios. Los compuestos útiles como inhibidores de Btk se describen, por ejemplo en el documento WO 2011/029046.

30 En consecuencia, existe una gran necesidad en la técnica de inhibidores eficaces para las Tec quinasas como la Btk. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

Resumen de la invención

35 La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:



I

40 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R¹ y el anillo A son como se definen en la reivindicación 1. Dichos compuestos son inhibidores de la familia de las Tec quinasas, que incluye Btk. En consecuencia, los compuestos proporcionados pueden usarse en una variedad de métodos que incluyen el tamizaje in vitro y ensayos de actividad así como también escenarios in vivo pre-clínicos, clínicos y terapéuticos, como se describe en detalle en la presente.

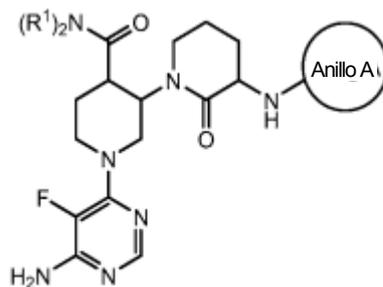
45 En determinadas modalidades, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden los compuestos proporcionados.

La presente invención proporciona compuestos para usar en un método para disminuir la actividad enzimática de Btk.

50 La presente invención proporciona compuestos para usar en un método para tratar un trastorno sensible a la inhibición de Btk en un sujeto que lo necesite. Dichos trastornos y métodos se describen en detalle en la presente.

Descripción detallada de determinadas modalidades

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I:

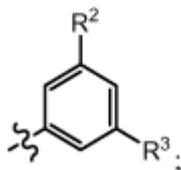


I

5 o una sal farmacéuticamente aceptable de este;
en donde:

10 cada R¹ es independientemente hidrógeno, un grupo alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico monocíclico, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido, o un grupo heterociclilalquilo opcionalmente sustituido que tiene 3-7 átomos de carbono y 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre; o dos grupos R¹ se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo heterocíclico monocíclico, saturado o parcialmente insaturado, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre;
15 en donde los grupos opcionalmente sustituidos pueden sustituirse con halógeno, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R)₂, -C(O)R, -CO₂R, -N(R)C(O)OR, -C(O)N(R)₂, -OC(O)R, -N(R)C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, o -S(O)₂N(R)₂;
cada R es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C₁₋₆;
o dos grupos R unidos al mismo nitrógeno se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo heterocíclico monocíclico, saturado o parcialmente insaturado, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido que tiene
20 1-2 heteroátomos, en donde cualquier segundo heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre;

El anillo A es



25 R² es -Cl o -F; y
R³ es -CF₃, -OCF₃, o -F.

Definiciones

30 Los compuestos de esta invención incluyen los descritos generalmente anteriormente y se ilustran adicionalmente por las clases, subclases y especies descritas en la presente. Como se usa en la presente, las siguientes definiciones se aplicarán a menos que se indique de cualquier otra manera. Para los propósitos de esta invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la tabla periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75ta Ed. Adicionalmente, los principios generales de química orgánica se describen en
35 "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5ta Ed., Ed.: Smith, M.B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

Las abreviaturas usadas en la presente tienen sus significados convencionales dentro de las materias química y biológica. Las estructuras y fórmulas químicas expuestas en la presente se estructuran de acuerdo con las reglas estándar de la valencia química conocidas en la materia química.

40 El término "alifático" o "grupo alifático", como se usa en la presente, significa una cadena lineal (es decir, no ramificada) o una cadena de hidrocarburo ramificada, sustituida o no sustituida que está completamente saturada o que contiene una o más unidades de insaturación, o un hidrocarburo monocíclico o hidrocarburo bicíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático (referido además en la presente como "carbociclo", "cicloalifático" o "cicloalquilo"), que tiene un punto único de unión al resto

de la molécula. A menos que se especifique de cualquier otra manera, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono alifáticos. En algunas modalidades, los grupos alifáticos contienen 1-5 átomos de carbono alifáticos. En algunas modalidades, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono alifáticos. En algunas modalidades, los grupos alifáticos contienen 1-3 átomos de carbono alifáticos, y aún en otras modalidades, los grupos alifáticos contienen 1-2 átomos de carbono alifáticos. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, alquenilo, alquinilo, sustituidos o no sustituidos, lineales o ramificados, e híbridos de estos tal como (cicloalquil)alquilo, (cicloalquenil)alquilo o (cicloalquil)alquenilo.

Como se usa en la presente, el término "cicloalifático" (o "carbociclo" o "cicloalquilo") se refiere a un hidrocarburo C3-C6 monocíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un punto único de unión al resto de la molécula.

Como se usa en la presente, los términos "heterociclo", "heterociclilo" y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente y se refieren a un resto heterocíclico monocíclico estable de 3 a 7 miembros que está saturado o parcialmente insaturado, y que tiene, además de los átomos de carbono, uno o más heteroátomos, preferentemente de uno a cuatro, como se definió anteriormente. Cuando se usa en referencia a un átomo del anillo de un heterociclo, el término "nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituido. Como ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno puede ser N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo), o ⁺NR (como en pirrolidinilo N-sustituido). El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido por un heterociclilo, en donde los restos alquilo y heterociclilo independientemente se sustituyen opcionalmente.

Un anillo heterocíclico puede unirse a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono lo que da como resultado una estructura estable y cualquiera de los átomos del anillo puede estar sustituido opcionalmente. Ejemplos de tales radicales heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofenil pirrolidinilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo y quinuclidinilo.

Como se usa en la presente, el término "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. El término "parcialmente insaturado" está destinado a abarcar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no está destinado a incluir restos arilo o heteroarilo, como se define en la presente.

El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio (que incluye, cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo, o silicio; la forma cuaternaria de cualquier nitrógeno básico o; un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico, por ejemplo N (como en 3,4-dihidro-2H-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR⁺ (como en pirrolidinilo N-sustituido)).

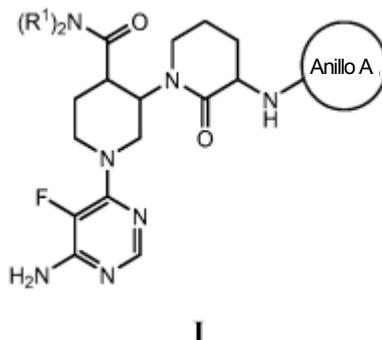
Como se usa en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad indebida, irritación, respuesta alérgica y similares, y se corresponden con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge y otros, describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19.

En determinadas modalidades, las formas neutras de los compuestos se regeneran al poner en contacto la sal con una base o ácido y aislar el compuesto de origen en la manera convencional. En algunas modalidades, la forma de origen del compuesto difiere de las diversas formas salinas en determinadas propiedades físicas, como solubilidad en disolventes polares.

A menos que se indique de cualquier otra manera, las estructuras representadas en la presente están destinadas a incluir, además, todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, los isómeros por doble enlace Z y E, y los isómeros conformacionales Z y E. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Adicionalmente, a menos que se indique de cualquier otra manera, las estructuras representadas en la presente están destinadas a incluir, además, compuestos que difieren solo en la presencia de uno o más átomos enriquecidos isotópicamente. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras que incluyen el reemplazo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un carbono por un carbono enriquecido ¹³C o ¹⁴C están dentro del alcance de esta invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas analíticas, como sondas en ensayos biológicos, o como agentes terapéuticos de acuerdo con la presente invención.

65 Compuestos

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I :



5 de una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde R^1 y el anillo A son como se definen en la reivindicación 1.

10 Inesperadamente se ha encontrado que los compuestos de fórmula I muestran propiedades ventajosas con respecto de conocidos inhibidores de Btk. En determinadas modalidades, los compuestos de fórmula I tienen una potencia aumentada. Sin desear estar atados a ninguna teoría en particular, se considera que los compuestos descritos en la presente poseen potencia mejorada como inhibidores de Btk, un mejor perfil por acción fuera del objetivo según se midió por inhibición de hERG o ensayos de inducción de PXR, o una combinación de estos. Los datos experimentales que muestran tales propiedades ventajosas se proporcionan en los siguientes ejemplos.

15 En algunas modalidades, ambos R^1 son hidrógeno. En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente un grupo alifático C_{1-6} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente un grupo alifático C_{1-5} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente un grupo alifático C_{1-4} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente un grupo alifático C_{1-3} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente un grupo alifático C_{1-2} . En algunas modalidades, ambos R^1 son metilo.

20 En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C_{1-6} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C_{1-5} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C_{1-4} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C_{1-3} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C_{1-2} . En algunas modalidades, cada R^1 es independientemente hidrógeno o metilo.

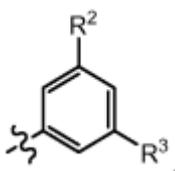
25 En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es un grupo alifático C_{1-6} . En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es metilo. En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es etilo. En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es (cicloalquil)alquilo C_{1-6} . En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es (cicloalquil) C_{1-6} .

30 En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es un grupo alifático C_{1-6} opcionalmente sustituido con -OR, en donde R es hidrógeno o un grupo alifático C_{1-6} .

35 En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es un grupo heterociclalquilo que tiene 3-7 átomos de carbono y 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es un heterociclo monocíclico de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido.

40 En algunas modalidades, dos grupos R^1 se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo heterocíclico monocíclico, saturado o parcialmente insaturado, de 3-5 miembros, opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas modalidades, dos grupos R^1 se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo de piperazina opcionalmente sustituido.

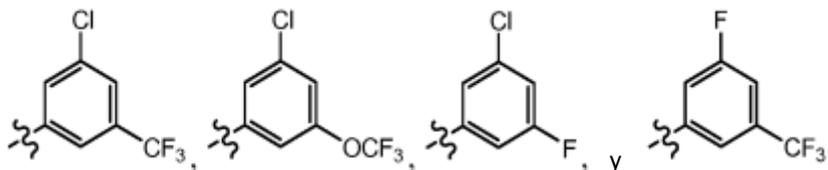
Como se describió anteriormente, el anillo A es



45

En determinadas modalidades, R^2 es -Cl. En otras modalidades, R^2 es -F. En algunas modalidades, R^3 es -CF₃. En algunas modalidades, R^3 es -OCF₃. En algunas modalidades, R^3 es -F.

En ciertas modalidades, el anillo A se selecciona del grupo que consiste en:

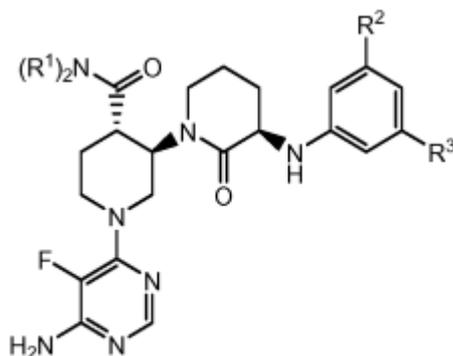


5

En algunas modalidades, en los compuestos descritos en la presente existe una relación transestereoquímica entre el sustituyente de piperidina que porta el grupo carboxamida y el sustituyente de piperidina que porta el grupo lactama.

10

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II-a:

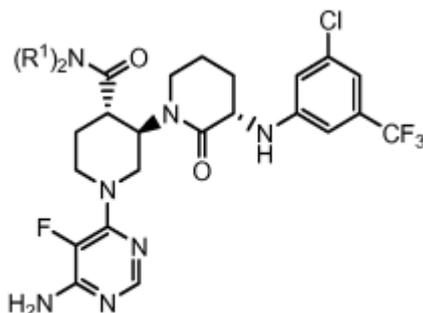


II-a

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es como se definió anteriormente y se describe en clases y subclases en la presente.

15

En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula II-b:

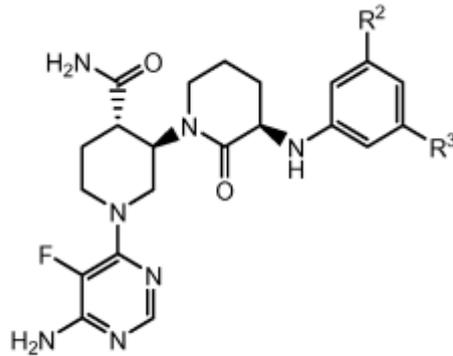


II-b

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada uno de R^1 , R^2 y R^3 es como se definió anteriormente y se describe en clases y subclases en la presente.

20

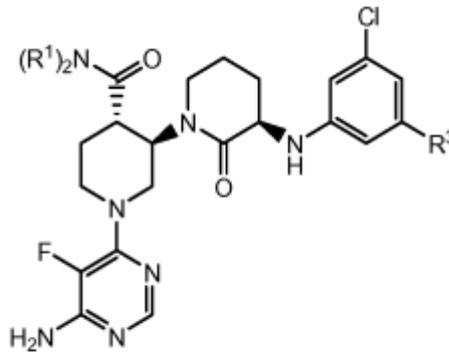
En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula III:



III

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada uno de R^2 y R^3 es como se definió anteriormente y se describe en clases y subclases en la presente.

- 5 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula IV:

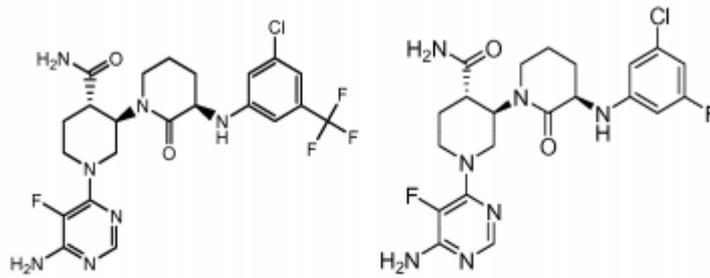


IV

- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde cada uno de R^1 y R^3 es como se definió anteriormente y se describe en clases y subclases en la presente. En algunas modalidades, ambos R^1 son hidrógeno. En algunas modalidades, un R^1 es hidrógeno y el otro R^1 es metilo.

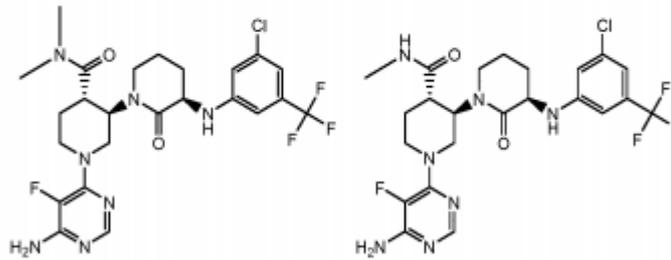
En algunas modalidades, un compuesto proporcionado es un compuesto representado en la tabla 1, más adelante, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

- 15 Tabla 1 – Compuestos seleccionados de fórmula I.



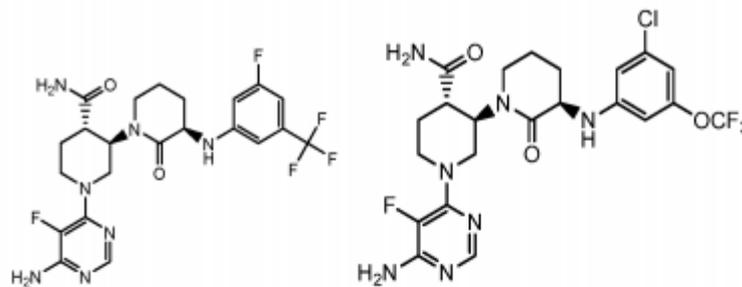
I-1

I-2



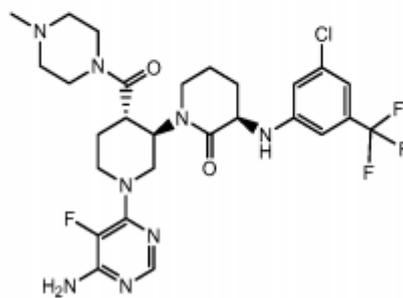
I-3

I-4



I-5

I-6

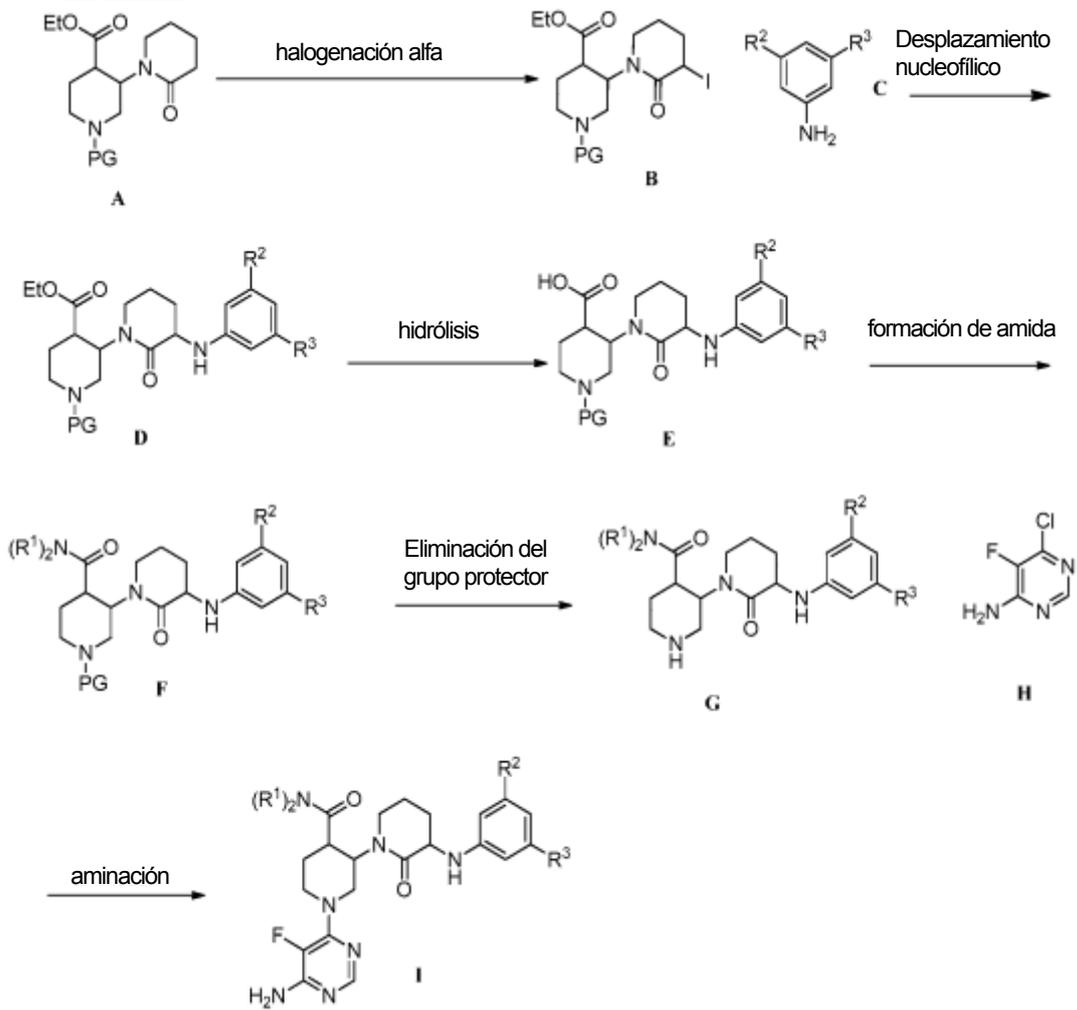


I-7

5 Los compuestos de la invención se sintetizan mediante una combinación adecuada de métodos sintéticos generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la invención son muy evidentes y accesibles para los expertos en la materia relevante. El análisis más adelante se ofrece para ilustrar algunos de los diversos métodos disponibles para usar en la obtención de los compuestos de la invención. Sin embargo, el análisis no está destinado a definir el alcance de las reacciones o las secuencias de reacciones que son útiles para preparar los compuestos de la presente invención.

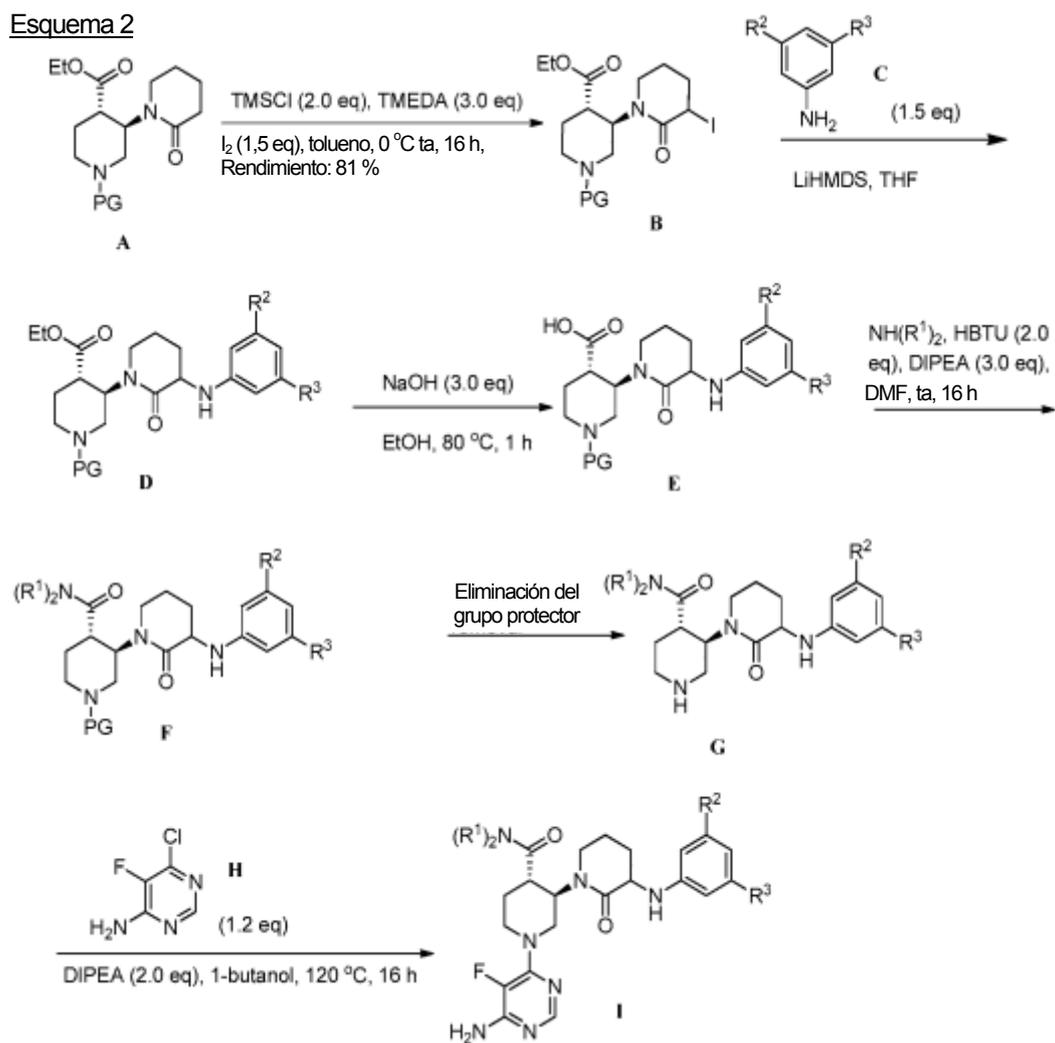
Los compuestos de fórmula I pueden prepararse generalmente de acuerdo con el esquema 1.

Esquema 1

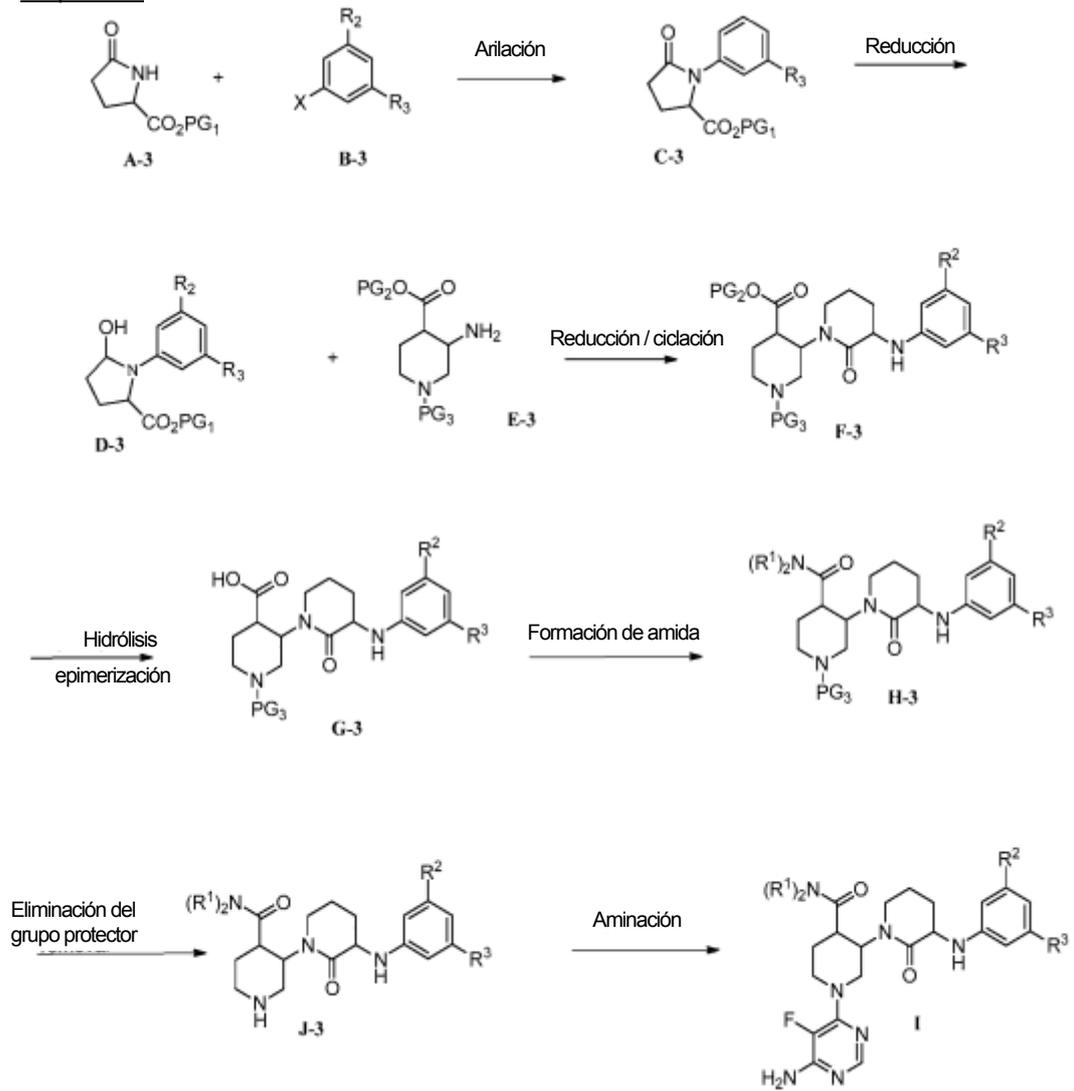


Los compuestos de fórmula I también pueden prepararse generalmente de acuerdo con los esquemas 2, 3, 3a, 4, 4a, 5 o 5a.

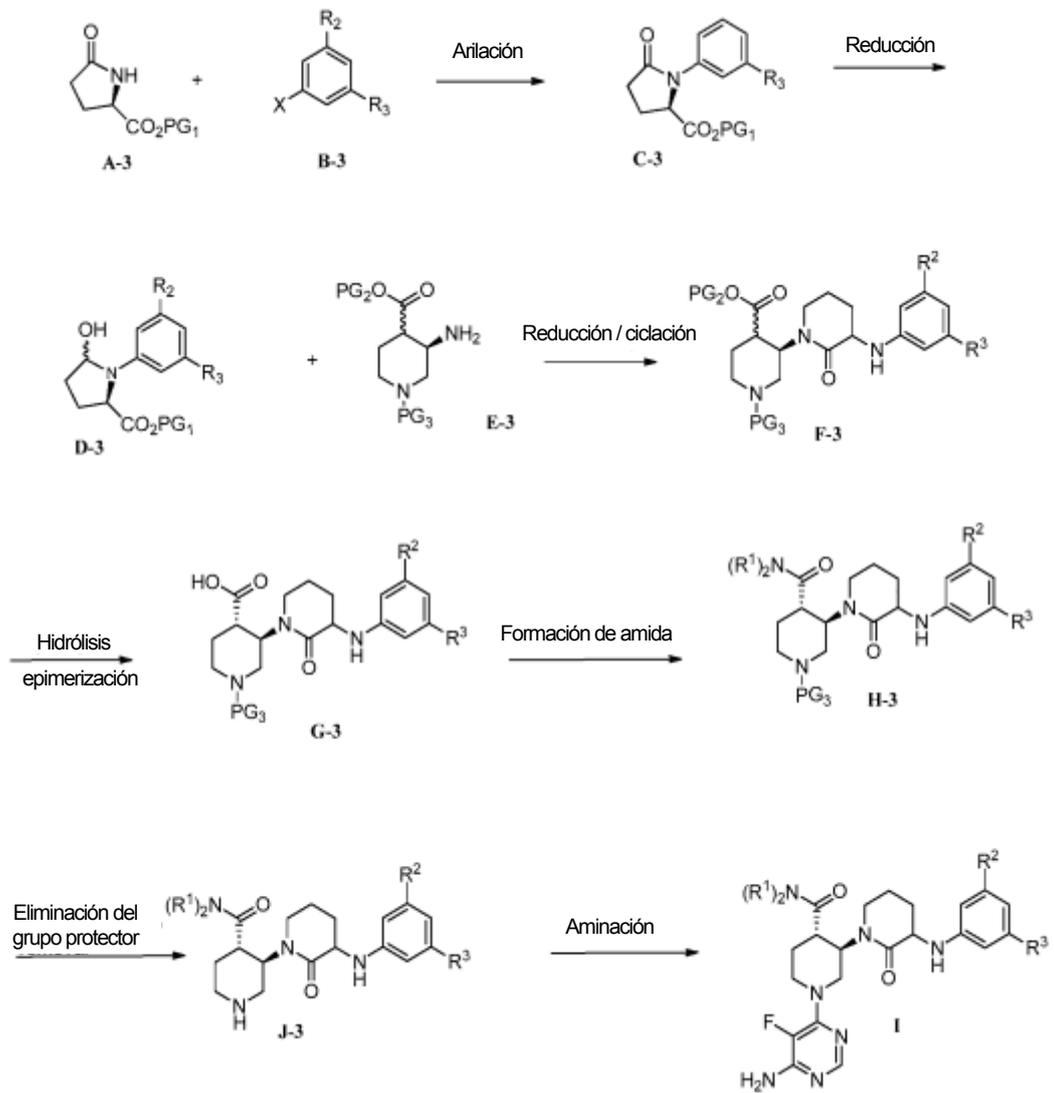
Esquema 2



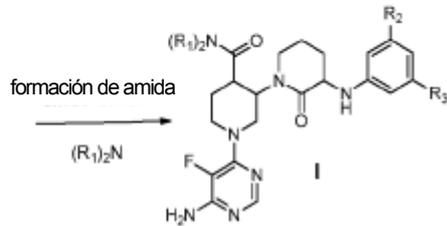
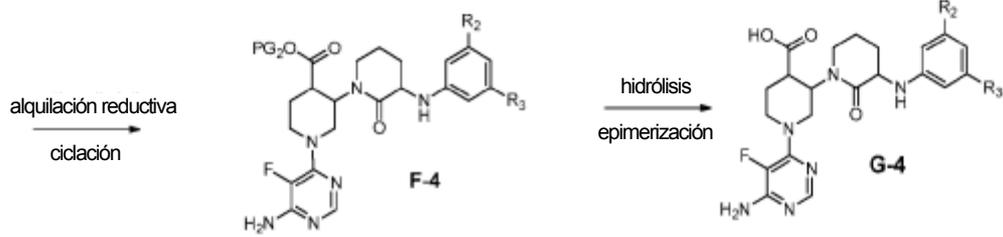
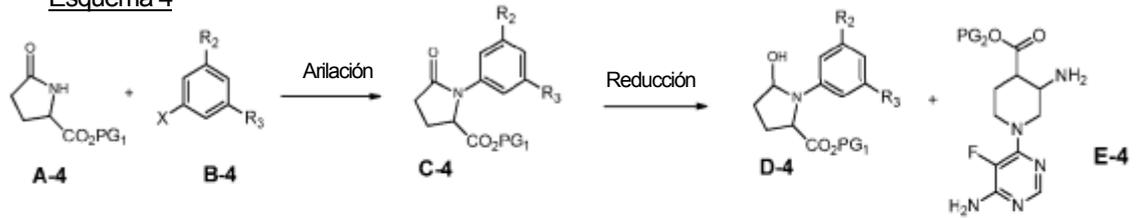
Esquema 3



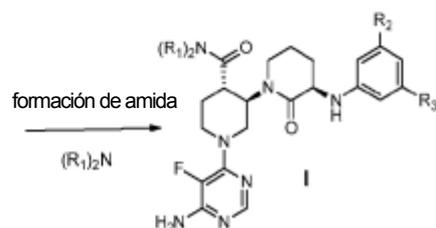
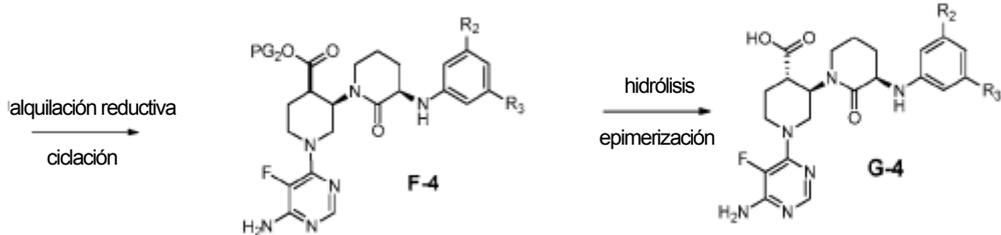
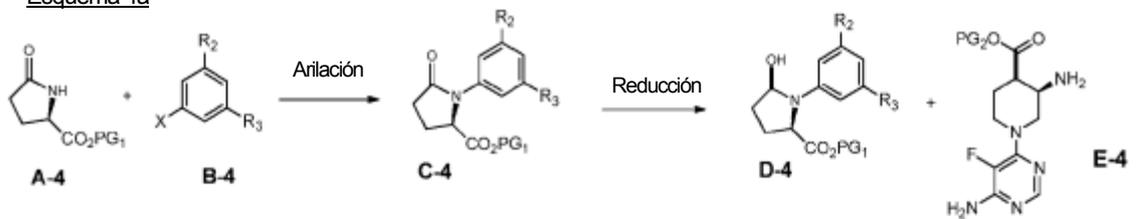
Esquema 3a

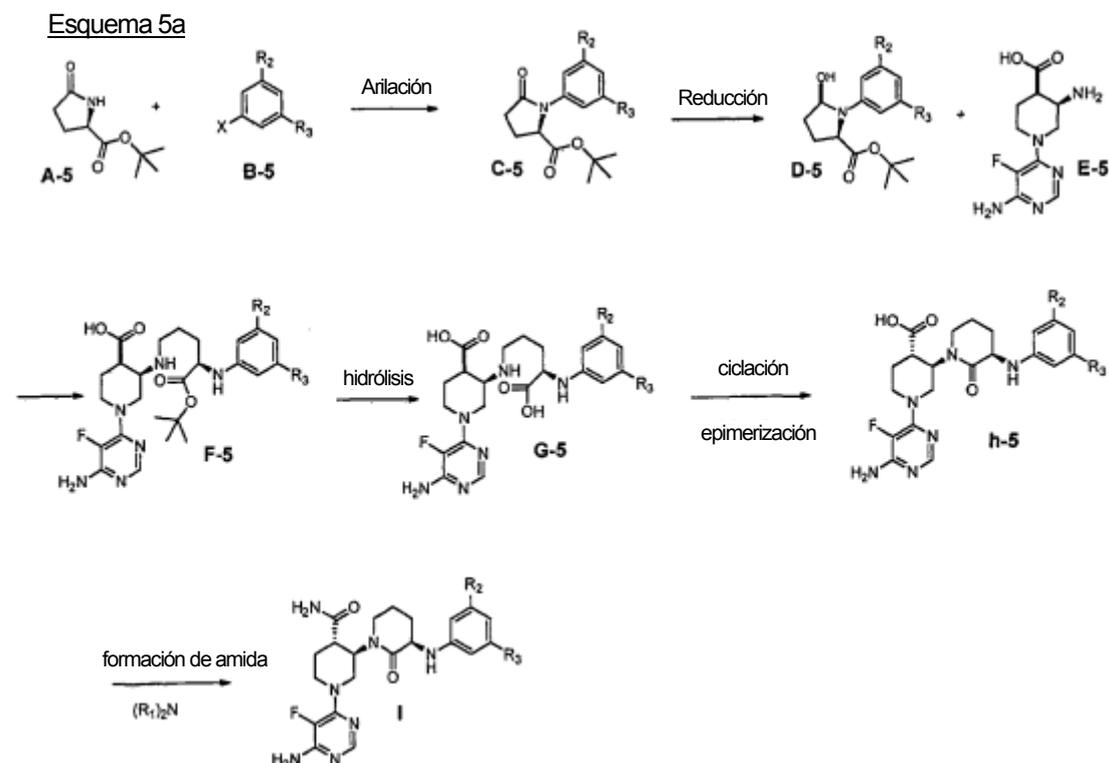
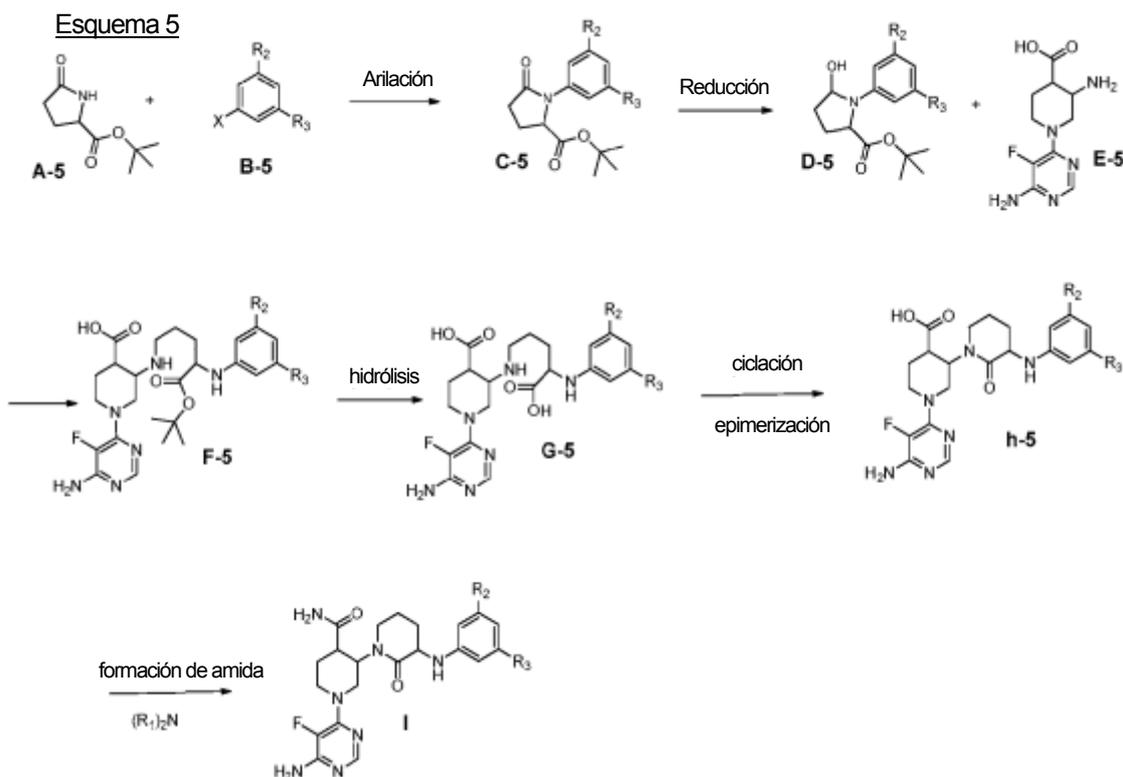


Esquema 4



Esquema 4a





- 5 Los grupos PG, PG₁, PG₂ y PG₃ de los compuestos en los esquemas 1 a 5a son cada uno independientemente un grupo protector adecuado. Dichos grupos protectores de éster y amina se conocen en la técnica y se describen en detalle en *Protecting Groups in Organic Synthesis*, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ra edición, John Wiley & Sons, 1999. En algunas modalidades, un grupo protector es un grupo Boc.
- 10 En determinadas modalidades, cada una de las etapas de síntesis en los esquemas 1 a 5a puede realizarse secuencialmente con aislamiento de cada intermediario después de cada etapa. Alternativamente, cada una de las

etapas como se representa en los esquemas 1, 2, 3 y 4 anteriormente, puede realizarse de una manera en que no se lleva a cabo el aislamiento de uno o más intermediarios.

5 En determinadas modalidades, todas las etapas de la síntesis mencionada anteriormente pueden realizarse para preparar el producto final deseado. En otras modalidades, pueden realizarse dos, tres, cuatro, cinco o más etapas secuenciales para preparar un intermediario o el producto final deseado.

Usos, formulación y administración

10 En determinadas modalidades, los compuestos de la presente invención son para usar en medicina. En algunas modalidades, la presente invención proporciona compuestos para usar en un método para disminuir la actividad enzimática de una quinasa en la familia de las Tec quinasas (por ejemplo, Tec, Btk, Itk, Txk, Lck y Bmx). En algunas modalidades, tales usos incluyen poner en contacto una quinasa de la familia de las Tec quinasas con una cantidad eficaz de un inhibidor de la familia de las Tec quinasas. Por lo tanto, la presente invención proporciona además compuestos para usar en un método para inhibir la actividad enzimática de la familia de las Tec quinasas al poner en contacto un miembro de la familia de las Tec quinasas con un inhibidor de la familia de las Tec quinasas de la presente invención. Como se usa en la presente, el término "miembro de la familia de las Tec quinasas" se refiere a cualquier tirosina quinasa no receptora en la familia de las Tec quinasas. En algunas modalidades, los miembros de la familia de las Tec quinasas son Tec, Btk, Itk, Txk, Lck y Bmx.

20 En algunas modalidades, la presente invención proporciona compuestos para usar en un método para disminuir la actividad enzimática de Btk. En algunas modalidades, tales usos incluyen poner en contacto una Btk con una cantidad eficaz de un inhibidor de Btk. Por lo tanto, la presente invención proporciona además compuestos para usar en un método para inhibir la actividad enzimática de Btk al poner en contacto una Btk con un inhibidor de Btk de la presente invención.

30 Actividad enzimática de Btk, como se usa en la presente, se refiere a la actividad enzimática de la quinasa Btk. Por ejemplo, cuando la actividad enzimática de Btk disminuye, la unión a PIP3 y/o la fosforilación de PLC γ disminuye. En algunas modalidades, la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) del inhibidor de Btk contra Btk es menor que 1 μ M. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es menor que 500 nM. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es menor que 100 nM. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es menor que 10 nM. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es de 0,1 nM a 10 μ M. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es de 0,1 nM a 1 μ M. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es de 0,1 nM a 100 nM. En algunas modalidades, la IC₅₀ del inhibidor de Btk contra Btk es de 0,1 nM a 10 nM.

40 En algunas modalidades, los inhibidores de dichas Tec quinasas son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos que pueden aliviarse mediante la inhibición (es decir, disminución) de la actividad enzimática de una o más Tec quinasas. Los compuestos de la invención son eficaces inhibidores de las quinasas de la familia Tec y por lo tanto serían útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad de una o más de las quinasas de la familia Tec. El término "enfermedades" significa enfermedades, síndromes o síntomas de una enfermedad. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos para tratar trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios y cánceres en un sujeto que lo necesite. Dichos métodos incluyen administrar al sujeto una cantidad con eficacia terapéutica de un inhibidor de quinasa Tec, Btk, Itk, Txk, Lck, y/o Bmx.

50 El término "trastornos autoinmunitarios" incluye enfermedades o trastornos que implican una respuesta inmunitaria inadecuada contra antígenos nativos, como encefalomielite diseminada aguda (ADEM), enfermedad de Addison, alopecia areata, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (APS), anemia hemolítica, hepatitis autoinmunitaria, penfigoide ampolloso (BP), enfermedad celíaca, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, lupus o lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad del tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, hemofilia con inhibidores, anemia perniciosa, polimiositis, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjögren, arteritis temporal y granulomatosis de Wegener. El término "trastornos inflamatorios" incluye enfermedades o trastornos que implican inflamación aguda o crónica como alergias, asma (por ejemplo, asma alérgica), dermatitis atópica, prostatitis, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica (PID), enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), daño por reperfusión, artritis reumatoide, rechazo de trasplantes (que incluye pacientes con trasplante con una reactividad cruzada positiva) y vasculitis. En determinadas modalidades, la presente invención proporciona métodos para tratar enfermedades, trastornos o afecciones que están aprobados para el tratamiento con rituximab (un anticuerpo monoclonal contra CD20), que incluye linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crónica (CLL), RA, granulomatosis de Wegener (WG) y poliangiitis microscópica (MPA). En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar artritis reumatoide (RA), SLE o dermatitis atópica mediante el uso de los compuestos descritos en la presente.

65 El término "cáncer" incluye enfermedades o trastornos que implican un crecimiento celular y/o proliferación anormales, tal como glioma, carcinoma tiroideo, carcinoma de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo carcinoma de

pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma gástrico, tumores del estroma gastrointestinal, carcinoma pancreático, carcinoma de las vías biliares, carcinoma ovárico, carcinoma endometrial, carcinoma de próstata, carcinoma de células renales, linfoma (por ejemplo, linfoma anaplásico de células grandes), leucemia (por ejemplo leucemia mieloide aguda, leucemia de células T, leucemia linfocítica crónica), mieloma múltiple, mesotelioma maligno, melanoma maligno y cáncer de colon (por ejemplo cáncer colorrectal con alta inestabilidad de microsátélites). En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para tratar leucemia o linfoma.

El término "sujeto", como se usa en la presente, se refiere a un mamífero al que se le administra una composición farmacéutica. Sujetos ilustrativos incluyen seres humanos, así como animales de laboratorio y veterinaria como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos, conejos, ratas, ratones y mamíferos acuáticos.

Indicaciones seleccionadas e inhibición de células B

Como se describió anteriormente, los compuestos proporcionados son útiles para el tratamiento de enfermedades, que incluyen RA y SLE. Como se describe en más detalle más adelante, estas enfermedades se asocian con células B. Por lo tanto, la presente descripción abarca el reconocimiento de que los compuestos proporcionados son útiles como compuestos terapéuticos para estas y otras indicaciones.

La desregulación del sistema inmunitario es fundamental para la patogénesis (Panayi GS, y otros *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27:317-334) de RA. Aunque la mayoría de los leucocitos infiltrantes en el sinovio son linfocitos T (principalmente células T CD4+ activadas) y células de origen de monocitos/macrófagos (que liberan citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF-alfa e IL-6 y enzimas proteolíticas que incluyen colagenasas y metaloproteinasas), en el líquido sinovial también se encuentran células B y células plasmáticas (Zhang Z, Bridges SL. *Rheum Dis Clin North Am* 2001; 27:335-353). Un papel evidente para las células B y sus funciones efectoras asociadas en RA se han demostrado mediante la eficacia de rituximab, un compuesto terapéutico selectivo que disminuye las células B, que está aprobado para el tratamiento de RA (Cohen SB, y otros; REFLEX Trial Group. *Arthritis Rheum.* 2006 Sep; 54(9):2793-806).

Aunque la etiología de SLE no se comprende totalmente, autoanticuerpos patogénicos y la deposición de complejos inmunitarios parecen ser críticos para el desarrollo de daño tisular de amplia distribución (Klippel JH, y otros *Primer on the rheumatic diseases.* Atlanta: Arthritis Foundation; 2001). La activación mediada por autoanticuerpos y complejos inmunitarios puede estudiarse mediante la medición de la inhibición de activación de macrófagos por macrófagos estimulados a través de receptores de Fc (véase los ejemplos - activación de FcγR de macrófagos primarios humanos). La pérdida de tolerancia a autoantígenos finalmente conduce a la estimulación de células B para producir auto-anticuerpos frecuentemente dirigidos contra componentes nucleares o citoplásmicos. Los anticuerpos contra los componentes nucleares (anticuerpos antinucleares [ANA]) se dirigen a antígenos nucleares que incluyen ADN (típicamente ADN bicatenario [ADNbc]), ARN, histonas y ribonucleoproteínas nucleares pequeñas. Estos anticuerpos se combinan con autoantígenos para formar complejos inmunitarios que se depositan en los tejidos, inducen reacciones inflamatorias y conducen al daño tisular. Además de sus roles en la producción de autoanticuerpos patogénicos, las células B también funcionan como células presentadoras de antígenos (APC) a las células T por lo tanto juegan un papel en la iniciación de una respuesta con especificidad antigénica. Dado el papel central del brazo humoral del sistema inmunitario en la patogénesis de SLE, las células B o la vía de las células B representan dianas terapéuticas convenientes. Belimumab, un anticuerpo monoclonal recientemente aprobado para SLE, bloquea la unión del BAFF a sus receptores que se expresan en las células B. Estos receptores sirven para activar y potenciar la supervivencia de las células B lo cual es coherente con una reducción de las células B circulantes que se observa después del tratamiento con belimumab. Véase además Chan OT, y otros *Immunol Rev.* 1999b;169:107-121 ; Navarra SV, y otros *Lancet.* 2011 Feb 26;377(9767):721-31; Furie R, y otros *Arthritis Rheum.* 2011 Dec;63(12):3918-30. El papel de las células B y las células de linaje mieloide en las enfermedades autoinmunitarias como SLE se apoya además en una publicación reciente que describe la eficacia en un modelo animal preclínico de SLE donde los ratones se tratan con un inhibidor irreversible de Btk de molécula pequeña (Honigberg, L.A. *PNAS.* 2010; 107: 13075).

Combinaciones

En determinadas modalidades, un compuesto de la presente invención se administra en combinación con otro agente. En algunas modalidades, un compuesto de la presente invención es útil para el tratamiento de RA y se administra en combinación con un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD), que incluye sin limitación: metotrexato, abatacept, azatioprina, certolizumab, cloroquina e hidroxiclороquina, ciclosporina, D-penicilamina, adalimumab, etanercept, golimumab, sales de oro (que incluyen auranofín y aurotiomalato de sodio), infliximab, leflunomida, minociclina, rituximab, sulfasalazina, tocilizumab, o combinaciones de estos. En algunas modalidades, un compuesto de la presente invención se administra en combinación con un NSAID o corticosteroide. En algunas modalidades, un compuesto de la presente invención es útil para el tratamiento de SLE y se administra en combinación con un agente para el tratamiento de SLE, que incluye sin limitación: corticosteroides, antimaláricos, belimumab, micofenolato de mofetilo (MMF) o micofenolato de sodio, azatioprina, o combinaciones de estos. En algunas modalidades, un compuesto de la presente invención es útil para el tratamiento de la dermatitis atópica y se

administra en combinación con un agente tópico para el tratamiento de la dermatitis atópica, que incluye sin limitación: esteroides tópicos, tacrolimus, metotrexato, furoato de mometasona (MMF), azatioprina, retinoides o combinaciones de estos.

5 Ensayos

Para desarrollar inhibidores útiles de la familia de las Tec quinasas, los inhibidores candidatos capaces de disminuir la actividad enzimática de la familia de las Tec quinasas pueden identificarse in vitro. La actividad de los compuestos inhibidores puede analizarse con la utilización de métodos conocidos en la técnica y/o los métodos expuestos en la presente.

Los compuestos que disminuyen la actividad enzimática de los miembros de la familia de las Tec quinasas pueden identificarse y analizarse mediante el uso de un miembro biológicamente activo de la familia de las Tec quinasas, lo mismo recombinante o de origen natural. Las Tec quinasas pueden encontrarse en células nativas, aislarse in vitro, o coexpresarse o expresarse en una célula. La medición de la reducción en la actividad enzimática del miembro de la familia de las Tec quinasas en presencia de un inhibidor respecto de la actividad en ausencia del inhibidor puede realizarse mediante el uso de una variedad de métodos conocidos en la técnica, como los ensayos POLYGAT-LS descritos más adelante en los ejemplos. Otros métodos para analizar la actividad de Btk y otras Tec quinasas se conocen en la técnica. La selección de los métodos de ensayo adecuados está dentro de las habilidades de los expertos en la técnica.

Una vez que se identifican los compuestos que son capaces de reducir la actividad enzimática de los miembros de la familia de las Tec quinasas, los compuestos pueden analizarse adicionalmente para determinar su capacidad para inhibir selectivamente un miembro de la familia de las Tec quinasas respecto de otras enzimas.

Los compuestos pueden analizarse adicionalmente en modelos celulares o modelos animales para determinar su capacidad para provocar cambios detectables en el fenotipo relacionado con la actividad del miembro de la familia de las Tec quinasas. Además de los cultivos celulares, los modelos animales pueden usarse para analizar a los inhibidores de miembros de la familia de las Tec quinasas en cuanto a su capacidad para tratar trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios o cáncer en un modelo animal.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I o un compuesto de fórmula I en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un portador).

Las composiciones farmacéuticas incluyen isómeros ópticos, diastereómeros, o sales farmacéuticamente aceptables de los inhibidores descritos en la presente. El compuesto de fórmula I incluido en la composición farmacéutica puede estar unido covalentemente a un resto del portador, como se describió anteriormente. Alternativamente, el compuesto de fórmula I incluido en la composición farmacéutica no se une covalentemente a un resto del portador.

Un "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente se refiere a excipientes farmacéuticos, por ejemplo, sustancias portadoras orgánicas o inorgánicas, aceptables farmacéuticamente, fisiológicamente, adecuadas para la administración enteral o parenteral que no reaccionan perjudicialmente con el agente activo. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen agua, soluciones salinas (como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas y carbohidratos como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinil pirrolidina. Dichas preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, tampones, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos de la invención.

Los compuestos de la invención pueden administrarse solos o pueden coadministrarse al sujeto. La coadministración está destinada a incluir la administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Las preparaciones pueden combinarse, además, cuando se desee, con otras sustancias activas (por ejemplo para reducir la degradación metabólica).

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse y administrarse en una amplia variedad de formas de dosificación oral, parenteral y tópica. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal o intraperitoneal). Además, los compuestos descritos en la presente pueden administrarse mediante inhalación, por ejemplo, intranasalmente. Adicionalmente, los compuestos de la presente invención pueden administrarse por vía transdérmica. Se prevé además que pueden usarse múltiples vías de administración (por ejemplo, intramuscular, oral, transdérmica) para administrar los compuestos de la invención.

Para preparar las composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de la presente invención, los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones de formas sólidas incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas, sellos, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que pueden actuar además como diluyentes, agentes saborizantes, aglutinantes, conservantes, agentes desintegrantes de comprimidos, o un material encapsulante.

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

Los polvos y comprimidos contienen preferentemente de 5 % a 70 % del compuesto activo. Los portadores adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de baja fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" está destinado a incluir la formulación del compuesto activo con material encapsulante como un portador que proporciona una cápsula en la que el componente activo con o sin otros portadores, está rodeado por un portador, que por lo tanto está en asociación con él. Similarmente, se incluyen sellos y pastillas. Los comprimidos, polvos, cápsulas, píldoras, sellos y pastillas pueden usarse como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

Para preparar supositorios, una cera de baja fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, primero se fusiona y el componente activo se dispersa homogéneamente en ellos, como por agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte después en moldes de tamaños convenientes, se deja enfriar, y así solidificar.

Las preparaciones de formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para la inyección parenteral, las preparaciones líquidas pueden formularse en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

Cuando se desean o necesitan una aplicación parenteral, las mezclas particularmente adecuadas para los compuestos de la invención son soluciones estériles, inyectables, preferentemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones, o implantes, que incluyen supositorios. En particular, los portadores para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de maní, aceite de sésamo, polímeros en bloque de polioxietileno y similares. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Los compuestos de la invención pueden incorporarse, además, en liposomas o administrarse por medio de bombas transdérmicas o parches. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para usar en la presente invención incluyen las descritas, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17ma Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y el documento WO 96/05309.

Las soluciones acuosas adecuadas para el uso oral pueden prepararse mediante la disolución del componente activo en agua y añadir colorantes adecuados, sabores, estabilizadores y agentes espesantes según se desee. Las suspensiones acuosas adecuadas para el uso oral pueden obtenerse mediante la dispersión del componente activo dividido finamente en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y otros agentes de suspensión bien conocidos.

Se incluyen, además, preparaciones de formas sólidas que están destinadas a convertirse, poco antes del uso, en preparaciones de formas líquidas para la administración oral. Dichas formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, sabores, estabilizadores, tampones, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

La preparación farmacéutica está preferentemente en una forma de dosificación unitaria. En dicha forma la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empacada, el empaque contiene cantidades discretas de la preparación, como comprimidos, cápsulas y polvos empacados en frascos o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, tableta, sello, o la propia pastilla, o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de estas en forma empacada.

La cantidad del componente activo en una preparación de dosis unitaria puede variar o ajustarse de 0,1 mg a 10000 mg, más típicamente 1,0 mg a 1000 mg, más típicamente 10 mg a 500 mg, de acuerdo con la aplicación particular y la potencia del componente activo. La composición puede contener además, si se desea, otros agentes terapéuticos compatibles.

Algunos compuestos pueden tener una solubilidad en agua limitada y por lo tanto pueden necesitar un tensoactivo u otro codisolvente adecuado en la composición. Dichos codisolventes incluyen: Polisorbato 20, 60 y 80; Pluronic F-68, F-84 y P-103; ciclodextrina; y aceite de ricino polioxil 35. Dichos codisolventes se emplean típicamente a un nivel entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 2 % en peso.

Una viscosidad mayor que la de soluciones acuosas simples pueden ser conveniente para disminuir la variabilidad en el dispensado de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación, y/o para mejorar de cualquier otra manera la formulación. Dichos agentes generadores de viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, metil celulosa, hidroxipropil metilcelulosa, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, sulfato de condroitina y sales de estos, ácido hialurónico y sales de este y combinaciones de lo anterior. Dichos agentes se emplean típicamente a un nivel entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 2 % en peso.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir adicionalmente componentes para proporcionar liberación sostenida y/o comodidad. Dichos componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos, de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos portadores de fármacos divididos finamente. Estos componentes se analizan en mayor detalle en las patentes de EE.UU. núms. 4,911,920; 5,403,841; 5,212,162; y 4,861,760.

Dosificaciones eficaces

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la presente invención incluyen composiciones en donde el ingrediente activo está contenido en una cantidad con eficacia terapéutica, es decir, en una cantidad eficaz para lograr el propósito deseado. La cantidad eficaz real para una aplicación en particular dependerá, entre otros, de la afección que se trata. Por ejemplo, cuando se administra en métodos para tratar cáncer, dichas composiciones contendrán una cantidad de ingrediente activo eficaz para lograr el resultado deseado (por ejemplo disminuir la cantidad de células cancerosas en un sujeto).

La dosificación y la frecuencia (dosis única o múltiples) del compuesto administrado puede variar en dependencia de una variedad de factores, que incluyen la vía de administración; el tamaño, la edad, el sexo, el estado de salud, el peso corporal, el índice de masa corporal, y la dieta del receptor; la naturaleza y el grado de los síntomas de la enfermedad que se trata (por ejemplo, la enfermedad sensible a la inhibición de Btk); la presencia de otras enfermedades u otros problemas relacionados con la salud; el tipo de tratamiento concurrente; y las complicaciones de cualquier enfermedad o régimen de tratamiento. Otros regímenes o agentes terapéuticos pueden usarse junto con los métodos y compuestos de la invención.

Para cualquier compuesto descrito en la presente, la cantidad con eficacia terapéutica puede determinarse inicialmente a partir de ensayos en cultivo celular. Las concentraciones objetivo serán las concentraciones del (de los) compuesto(s) activo(s) que sean capaces de disminuir la actividad enzimática quinasa según se mide, por ejemplo, mediante el uso de los métodos descritos.

Las cantidades con eficacia terapéutica para usar en seres humanos pueden determinarse a partir de modelos animales. Por ejemplo, puede formularse una dosis para seres humanos para lograr una concentración que se ha encontrado que es eficaz en animales. La dosificación en los seres humanos puede ajustarse mediante el seguimiento de la inhibición de quinasas y el ajuste de la dosificación mediante aumento o disminución, como se describió anteriormente. En determinadas modalidades, la dosis administrada está en el intervalo de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1000 mg por día, lo mismo una vez, dos veces, o más de dos veces diariamente.

Las dosificaciones pueden variarse en dependencia de los requerimientos del paciente y el compuesto que se emplea. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debe ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente en el tiempo. El tamaño de la dosis se determinará, además, por la existencia, la naturaleza y el grado de cualquier efecto adverso secundario. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después, la dosificación aumenta en incrementos pequeños hasta que se alcanza el efecto óptimo en esas circunstancias. En algunas modalidades, el intervalo de dosificación es 0,001 % a 10 % p/v. En algunas modalidades, el intervalo de dosificación es 0,1 % a 5 % p/v.

Las cantidades e intervalos de las dosificaciones pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles eficaces del compuesto administrado para la indicación clínica en particular que se trata. Esto proporcionará un régimen terapéutico que se corresponde con la gravedad del estado de enfermedad del individuo.

Para que la invención descrita en la presente pueda comprenderse más completamente, se exponen los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos tienen propósitos ilustrativos solamente y no deben interpretarse como limitantes de esta invención de ninguna manera.

Ejemplos

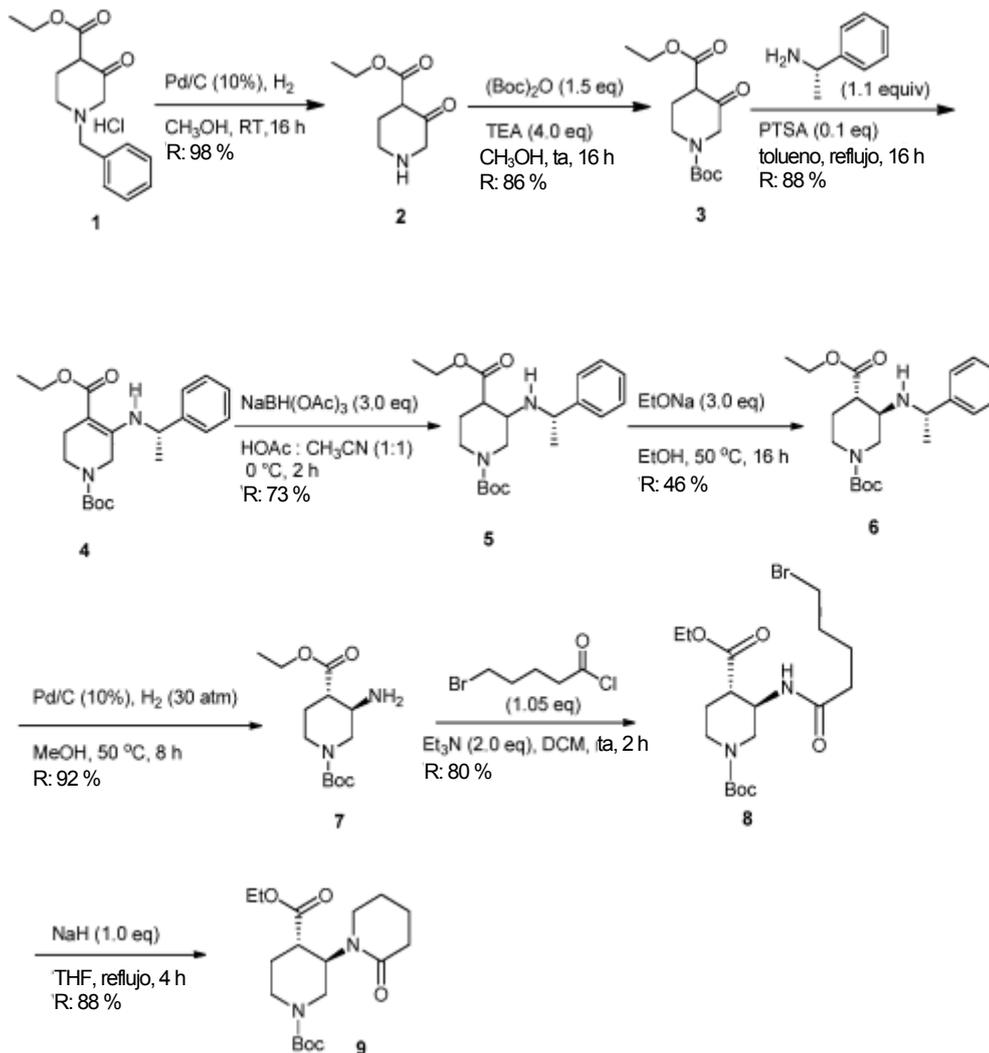
Como se describe en los ejemplos más adelante, en determinadas modalidades ilustrativas, los compuestos se preparan de acuerdo con los siguientes procedimientos generales. Se apreciará que, aunque los métodos generales describen la síntesis de determinados compuestos de la presente invención, los siguientes métodos generales y

otros métodos conocidos por un experto en la técnica, pueden aplicarse a todos los compuestos y subclases y especies de cada uno de estos compuestos, como se describe en la presente.

Ejemplo 1

5

Síntesis de (3'R,4'S)-1'-terc-butil 4'-etil 2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato



10 Preparación del intermediario 3-oxopiperidina-4-carboxilato de etilo. El 1-bencil-3-oxopiperidina-4-carboxilato de etilo 1 (15,0 g, 50,5 mmol, 1,0 equiv) se hidrogenó en presencia del catalizador Pd/C 10 % (1,5 g) en H₂ a presión atmosférica en MeOH (250 ml) durante 16 horas. El catalizador se filtró y el disolvente se concentró al vacío para producir 3-oxopiperidina-4-carboxilato de etilo 2 como un sólido de color amarillo claro (10,2 g, rendimiento: 98,0 %). ESI-MS (M+H)⁺: 172,1. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 4,23 (q, 2H), 3,75 (s, 2H), 3,37 (s, 2H), 3,20-3,16 (m, 2H), 2,44 (t, 1H), 1,25 (t, 3H).

15 Preparación de 1-terc-butil 4-etil 3-oxopiperidina-1,4-dicarboxilato. El 3-oxopiperidina-4-carboxilato de etilo 2 (10,2 g, 60,0 mmol, 1,0 equiv) se disolvió en MeOH seco (200 ml) y se añadió Et₃N (33,1 ml, 240 mmol, 4,0 equiv). La mezcla se agitó durante 1 hora y se añadió Boc₂O (19,5 g, 90,0 mmol, 1,5 equiv) y se agitó durante 16 horas. El disolvente se concentró al vacío y el crudo se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/EtOAc = 9:1) para producir el aceite amarillo claro 1-terc-butil 4-etil 3-oxopiperidina-1,4-dicarboxilato 3 (11,5 g, rendimiento: 86 %). ESI-MS (M+H-56)⁺: 216,0. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 4,24 (q, 2H), 4,03 (s, 2H), 3,49 (t, 2H), 2,33 (t, 2H), 1,47 (s, 9H), 1,31 (t, 3H).

25 Preparación de (S)-1-terc-butil 4-etil 3-((1-feniletil)amino)-5,6-dihidro piridina-1,4-(2H)-dicarboxilato. En un matraz seco equipado con una trampa de Dean-Stark y un condensador de reflujo, se disolvió 1-terc-butil 4-etil 3-oxopiperidina-1,4-dicarboxilato 3 (10,0 g, 37,0 mmol, 1,1 equiv) en tolueno (100 ml). Se añadieron S-(1-α-metilbenzilamina (4,9 g, 40,5 mmol, 1,1 equiv) y ácido p-toluenosulfónico monohidrato (0,7 g, 3,7 mmol, 0,1 equiv) y

la mezcla se calentó a reflujo durante 16 horas. La mezcla de reacción cruda se concentró al vacío para producir (S)-1-terc-butil 4-etil 3-((l-feniletil)amino)-5,6-dihidro piridina-1,4(2H)-dicarboxilato 4 (12,0 g, Y: 88 %) como un aceite anaranjado espeso que se usó en la próxima etapa sin purificación adicional, ESI-MS (M+H)⁺: 375,2.

5 Preparación de 1-terc-butil 4-etil 3-(((S)1-feniletil)amino)-5,6-dihidro piridina-1,4(2H) -dicarboxilato. 1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1,4-dicarboxilato 4 (11,2 g, 30,0 mmol, 1,0 equiv) se disolvió en una mezcla de CH₃CN (60 ml) y ácido acético (60 ml) y se enfrió a 0 °C. NaBH(OAc)₃ (19,0 g, 90,0 mmol, 3,0 equiv) se añadió lentamente y la mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a 0 °C. El NaHCO₃ saturado se añadió lentamente para neutralizar la solución para mantener la temperatura interna del matraz por debajo de 10 °C. La mezcla se extrajo con EtOAc (50 ml x 3). La capa orgánica combinada se secó (Na₂SO₄), filtró, concentró al vacío, y después se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/EtOAc =9:1) para producir 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino)-5,6-dihidro piridina-1,4(2H)-dicarboxilato 5 (8,2 g, Y: 73 %) como un aceite amarillo claro. ESI-MS (M+H)⁺: 377,2. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ:7,31-7,22 (m, 5H), 4,20 (q, 2H), 4,11-3,86 (m, 3H), 3,15 (s, 1H), 3,00-2,90 (m, 2H), 2,64 (d, 2H), 1,87-1,85 (m, 1H), 1,68 (s, 1H), 1,50-1,25 (m, 15H).

15 Preparación de trans-1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino) piperidina-1,4-dicarboxilato. El 1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1,4- dicarboxilato 5 (8,0 g, 21,2 mmol, 1,0 equiv) se disolvió en EtOH seco (20 ml) en N₂. En un matraz Schlenk separado secado al fuego se colocó EtOH seco (150 ml) y se añadió sodio (0,450 g, 63,6 mmol, 3,0 equiv) por porciones en N₂. La mezcla se mantuvo en N₂ y se ventiló para eliminar los gases desprendidos hasta que todo el sodio se disolvió. La solución limpia de 1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1,4-dicarboxilato se transfirió después a la solución de NaOEt, y la mezcla se agitó a 80 °C en N₂ durante 16 horas. El disolvente se eliminó al vacío, y se añadió salmuera (150 ml) y la mezcla se llevó a pH =10 con NaOH 1 N y se extrajo con EtOAc (100 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron (Na₂SO₄) y concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/EtOAc = 5:1) para producir (trans)-1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil) amino)piperidina-1,4-dicarboxilato 6 como un sólido amarillo claro (3,7 g, rendimiento: 46 %). ESI-MS (M+H)⁺: 377,2.

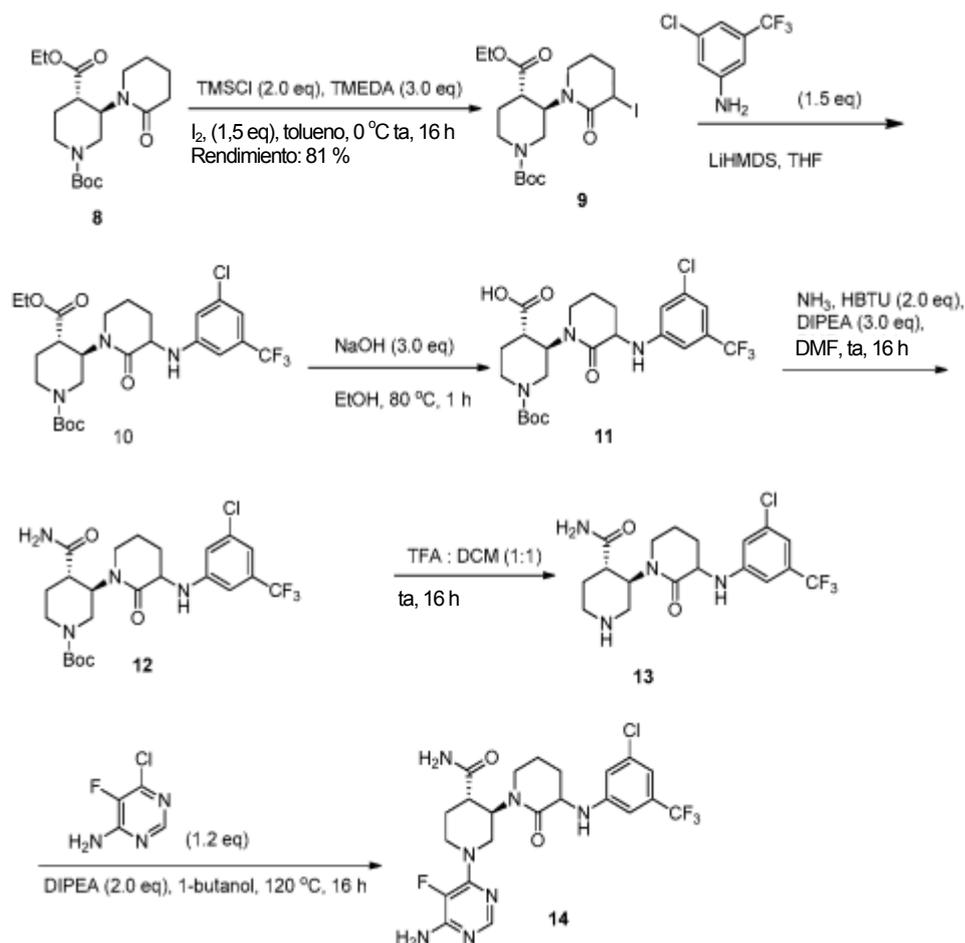
25 Preparación de trans-1-terc-butil 4-etil 3-aminopiperidina-1,4-dicarboxilato. Trans-1 -terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-1,4-dicarboxilato 6 (3,7 g, 8,3 mmol, 1,0 equiv) se hidrogenó en presencia del catalizador Pd/C 10 % (0,37 g) en H₂ a presión atmosférica 30 en MeOH (100 ml) a 50 °C durante 8 horas. El catalizador se filtró y el disolvente se eliminó al vacío para producir (trans)-1-terc-butil 4-etil 3-aminopiperidina-1,4-dicarboxilato 7 como un aceite amarillo claro (2,5 g, rendimiento: 92 %). ESI-MS (M+H)⁺: 273,1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 4,18 (q, 2H), 3,97-3,94 (m, 2H), 3,37 (s, 1H), 3,07-3,02 (m, 1H), 2,89-2,85 (m, 1H), 2,60-2,55 (m, 1H), 2,01-1,91 (m, 1H), 1,70-1,54 (m, 3H), 1,46 (s, 9H), 1,28 (t, 3H).

35 Síntesis de trans-1-terc-butil 4-etil 3-(5-bromopentanamido)piperidina - 1,4-dicarboxilato. A una solución de trans-1-terc-butil 4-etil 3-aminopiperidina -1,4-dicarboxilato 7 (2,5 g, 9,2 mmol, 1,0 equiv) en CH₂Cl₂ (50 ml), se añadió Et₃N (2,5 ml, 18,4 mmol, 2,0 equiv) a temperatura ambiente. Después de agitar la solución de reacción a temperatura ambiente durante 10 min, se añadió cloruro de 5-bromovalerilo (1,9 g, 9,6 mmol, 1,05 eq). La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se inactivó con H₂O (20 ml) y se extrajo con CH₂Cl₂ (50 ml x 3). La capa orgánica se recogió, se concentró al vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/EtOAc =1:1) para producir (trans)-1-terc-butil 4-etil 3-(5-bromopentanamido)piperidina -1,4-dicarboxilato 8 como un aceite amarillo (3,2 g, rendimiento: 80 %). ESI-MS (M+H-56)⁺: 379,0. ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃)δ:5,99 (d, 1H), 4,39-4,38 (m, 1H), 4,15 (q, 2H), 3,79-3,74 (m, 1H), 3,66-3,60 (m, 1H), 3,41 (t, 2H), 3,30-3,26 (m, 1H), 3,21-3,14 (m, 1H), 2,78-2,74 (m, 1H), 2,19 (t, 2H), 1,99-1,85 (m, 3H), 1,80-1,72 (m, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,27 (t, 3H).

45 Síntesis de trans-1'-terc- butil 4'-etil 2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato. A una solución de trans-1-terc-butil 4-etil 3-(5-bromopentanamido)piperidina-1,4-dicarboxilato 8 (3,0 g, 6,9 mmol, 1,0 equiv) en THF (20 ml), se añadió cuidadosamente NaH (276 mg, 6,9 mmol, 1,0 equiv) en porciones pequeñas a 0 °C. La solución de reacción se agitó hasta la condición de reflujo durante 4 horas. La mezcla se inactivó con H₂O (20 ml), y se extrajo con EtOAc (30 ml x 3). La capa orgánica se recogió, se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (sílice, éter de petróleo/EtOAc = 1:2) para producir (trans)-1'-terc-butil 4'-etil 2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato 9 como un aceite amarillo claro (2,1 g, rendimiento: 88 %). ESI-MS (M+H-56)⁺: 299,1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ:4,10 (q, 4H), 3,38-3,19 (m, 4H), 2,70-2,61 (m, 1H), 2,36-2,31 (m, 2H), 1,95-1,92 (m, 1H), 1,75-1,71 (m, 6H), 1,46 (s, 9H), 1,23 (t, 3H).

Ejemplo 2

60 Preparación de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida



5 Síntesis de trans-1'-terc-butil-4'-etil-3-yodo-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato. A la solución de trans-1'-terc-butil 4'-etil 2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato 8 (141 mg, 2,58 mmol, 1,0 equiv) en tolueno seco (10 ml) a 0 °C, se añadieron sucesivamente TMEDA (0,89 g, 7,7 mmol, 3,0 equiv) y TMSCl (0,6 mg, 1,0 mmol, 2,0 equiv) en N₂. Después de 0,5 horas, se añadió cuidadosamente I₂ (0,98 g, 3,87 mmol, 1,5 equiv) en porciones pequeñas. La solución de reacción se agitó a 0 °C a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml), se lavó con Na₂S₂O₃ saturado (20 ml × 2) y salmuera (20 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. El producto crudo 9 (2,2 g, Y: 81 %) se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional. ESI-MS (M+H-56)⁺: 424,9. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 4,78-4,73 (m, 1H), 4,19-4,04 (m, 4H), 3,55-3,30 (m, 4H), 3,24-3,16 (m, 2H), 2,73-2,60 (m, 1H), 2,22-2,14 (m, 2H), 1,96-1,78 (m, 2H), 1,70-1,60 (m, 1H), 1,44 (s, 9H), 1,25 (t, J=7,2 Hz, 3H).

15 Síntesis de trans-1'-terc-butil 4'-etil 3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato. Una solución 1,0 M de bis(trimetildisilil)amida de litio en THF (13 ml, 12 mmol, 2,0 equiv) se añadió mediante un embudo de adición a 10-15 °C a una solución de 3-cloro-5-(trifluorometil)anilina (15 g, 78 mmol, 1,2 equiv) en THF (13 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min y se añadió una solución de trans-1'-terc-butil-4'-etil-3-yodo-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'- dicarboxilato crudo 9 (3,7 g, 65 mmol, 1,0 equiv) en THF (13 ml) mediante un embudo de adición a 10-15 °C durante 30 min. Después de la adición, la reacción se agitó a la temperatura durante 30 min. Al terminar, la reacción se enfrió a 5 °C y se inactivó lentamente con agua (10 ml), manteniendo la temperatura por debajo de 20 °C. La reacción inactivada se extrajo con EtOAc (2 x 30 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera saturada (30 ml), se secaron (Na₂SO₄), filtraron y concentraron al vacío. El producto crudo resultante se purificó sobre gel de sílice eluyendo con un gradiente de 10 % a 75 % de EtOAc en heptanos para producir el producto deseado 10. ESI-MS (M+H-56)⁺: 463,1. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 6,92 (s, 1H), 6,71-6,69 (m, 2H), 4,17-4,06 (m, 4H), 3,78-3,68 (m, 2H), 3,46-3,36 (m, 3H), 3,23-3,07 (m, 2H), 2,73-2,65 (m, 1H), 2,44-2,37 (m, 1H), 2,03-1,85 (m, 3H), 1,71-1,61 (m, 2H), 1,46 (s, 9H), 1,27-1,19 (m, 3H).

25 Síntesis del ácido trans-1'-(terc -butoxicarbonil)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil) amino) -2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico. A una solución de trans-1'-terc-butil 4'-etil 3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1',4'-dicarboxilato 10 (180 mg, 0,33 mmol, 1,0 equiv) en EtOH (5 ml) se añadió NaOH (40 mg, 0,99 mmol, 3,0 equiv) y la solución se agitó a 80 °C durante 1 hora. El disolvente se concentró al vacío y el residuo se suspendió en agua (10 ml) y se ajustó a pH = 6 con HCl (4 N). El precipitado se filtró para producir el ácido (trans)-1'-(terc-butoxicarbonil)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico 11 (150 mg, Y: 82 %) como un sólido amarillo que se usó en la próxima etapa sin purificación adicional. ESI-MS (M+H-85)⁺: 463,1. ¹H

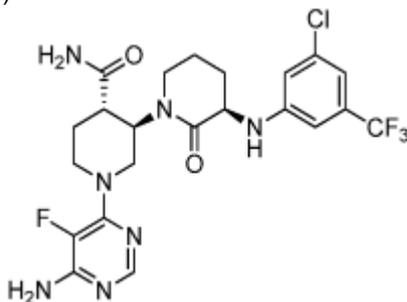
30

NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 6,85 (s, 1H), 6,82 (s, 1H), 6,78 (s, 1H), 4,12-3,96 (m, 4H), 3,53-3,37 (m, 2H), 3,11-3,04 (m, 2H), 2,75-2,67 (m, 1H), 2,24-2,18 (m, 1H), 1,98-1,89 (m, 3H), 1,71-1,58 (m, 2H), 1,44 (s, 9H).

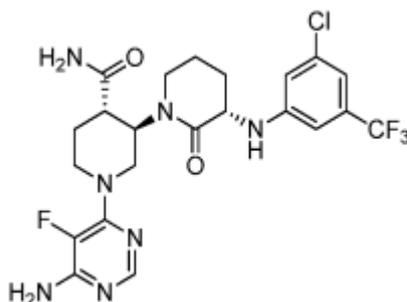
5 Síntesis de trans-terc-butil 4'-carbamoil-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1'-carboxilato. A la solución del ácido trans 1'-(terc-butoxicarbonil)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico 11 (70 mg, 0,14 mmol, 1,0 equiv) en DMF (2 ml), se añadió NH₄Cl (22 mg, 0,41 mmol, 3,0 equiv), HBTU (103 mg, 0,270 mmol, 2,0 equiv) y DIPEA (52 mg, 0,41 mmol, 3,0 equiv). La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, se diluyó con EtOAc (10 ml) y se lavó con agua (5 ml) y salmuera (5 ml). La fase orgánica se separó y concentró al vacío para producir un aceite crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con TFA al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto (trans)-terc-butil4'-carbamoil-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil) amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1'-carboxilato 12 (60 mg, rendimiento: 86 %) como un sólido claro. ESI-MS (M+H)⁺: 463,1. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 6,87-6,86 (m, 1H), 6,84-6,83 (m, 1H), 6,80 (s, 1H), 4,11-4,03 (m, 3H), 3,53-3,35 (m, 2H), 3,20-3,08 (m, 2H), 2,77-2,74 (m, 1H), 2,25-2,18 (m, 1H), 1,99-1,88 (m, 3H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

15 Síntesis de trans -3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. A la solución de trans-terc-butil 4'-carbamoil-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1'-carboxilato 12 (60 mg, 0,11 mmol) en CH₂Cl₂ (1,0 ml) se añadió CF₃CO₂H (1,0 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se concentró al vacío para producir el producto deseado 13 (43 mg, 90 %) que se usó directamente en la próxima etapa sin purificación adicional. ESI-MS (M+H)⁺: 419,0.

25 Síntesis de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. A una solución de trans-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino) -2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 13 (42 mg, 0,10 mmol, 1,0 equiv) en 1-butanol (2 ml), 6-cloro-5-fluoropirimidin-4-amina (18 mg, 0,12 mmol, 1,2 equiv) se añadió DIPEA (26 mg, 0,20 mmol, 2,0 equiv). La solución de reacción se agitó a 120 °C durante 16 horas. La mezcla se diluyó con EtOAc (20 ml), se lavó con H₂O (10 ml) y salmuera (10 ml), se secó (Na₂SO₄), filtró y concentró al vacío. El crudo se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con TFA al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto (trans)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 (44 mg, rendimiento: 83 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 530,0. HPLC: (214 nm: 100 %, 254 nm: 100 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,97 (s, 1H), 6,84 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,76 (s, 1H), 4,58-4,52 (m, 2H), 4,09-4,03 (m, 1H), 3,52-3,35 (m, 3H), 3,29-3,27 (m, 4H), 3,12-3,05 (m, 1H), 2,24-2,17 (m, 1H), 2,02-1,91 (m, 3H), 1,80-1,63 (m, 2H).

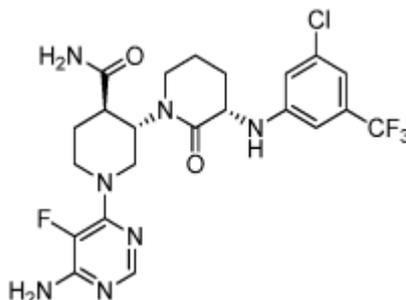


35 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros del compuesto 14 se separó en tres picos mediante SFC (IA (2 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) y el compuesto del título correspondió al pico 3. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 530,1 (M+1) @ 1,20 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 2,01 Hz, 1H), 7,38 (br. s., 1H), 6,94 (s, 2H), 6,75 - 6,87 (m, 2H), 6,41 - 6,66 (m, 3H), 4,29 (br. s., 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 1H), 3,96 - 4,18 (m, 2H), 3,44 (td, J= 6,15, 12,30 Hz, 1H), 3,24 - 3,33 (m, 1H), 3,10 (br. s., 1H), 2,88 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,13 (qd, J= 5,94, 12,30 Hz, 1H), 1,74 - 1,93 (m, 3H), 1,58 - 1,74 (m, 1H), 1,41 - 1,58 (m, 1H).

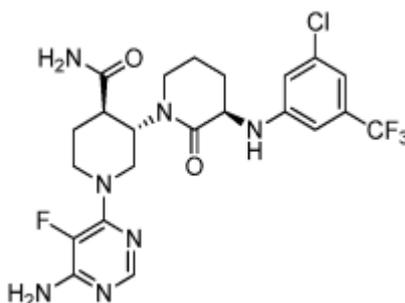


45 (3S,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros del compuesto 14 se separó en tres picos mediante SFC (IA (2 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) y el compuesto del título correspondió al pico 2.

LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 530,1 (M+1) @ 1,19 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (br. s., 1H), 6,98 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,72 - 6,88 (m, 2H), 6,57 (s, 2H), 6,54 (d, J= 7,78 Hz, 1H), 4,05 - 4,33 (m, 4H), 3,37 (t, J= 6,27 Hz, 2H), 3,11 (br. s., 1H), 2,94 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,02 - 2,16 (m, 1H), 1,75 - 1,92 (m, 3H), 1,57 - 1,74 (m, 1H), 1,36 - 1,54 (m, 1H).



5 (3S,3'S,4R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros del compuesto 14 se separó en tres picos mediante SFC (IA (2 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 1 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del
10 título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 530,1 (M+1) @ 1,20 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,38 (br. s., 1H), 6,94 (s, 2H), 6,83 (s, 1H), 6,80 (s, 1H), 6,42 - 6,66 (m, 3H), 4,18 - 4,47 (m, 2H), 3,95 - 4,18 (m, 2H), 3,39 - 3,52 (m, 1H), 3,24 - 3,31 (m, 1H), 3,10 (br. s., 1H), 2,88 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,13 (qd, J= 5,91, 12,39 Hz, 1H), 1,73 - 1,92 (m, 3H), 1,58 - 1,73 (m, 1H), 1,42 - 1,58 (m, 1H).



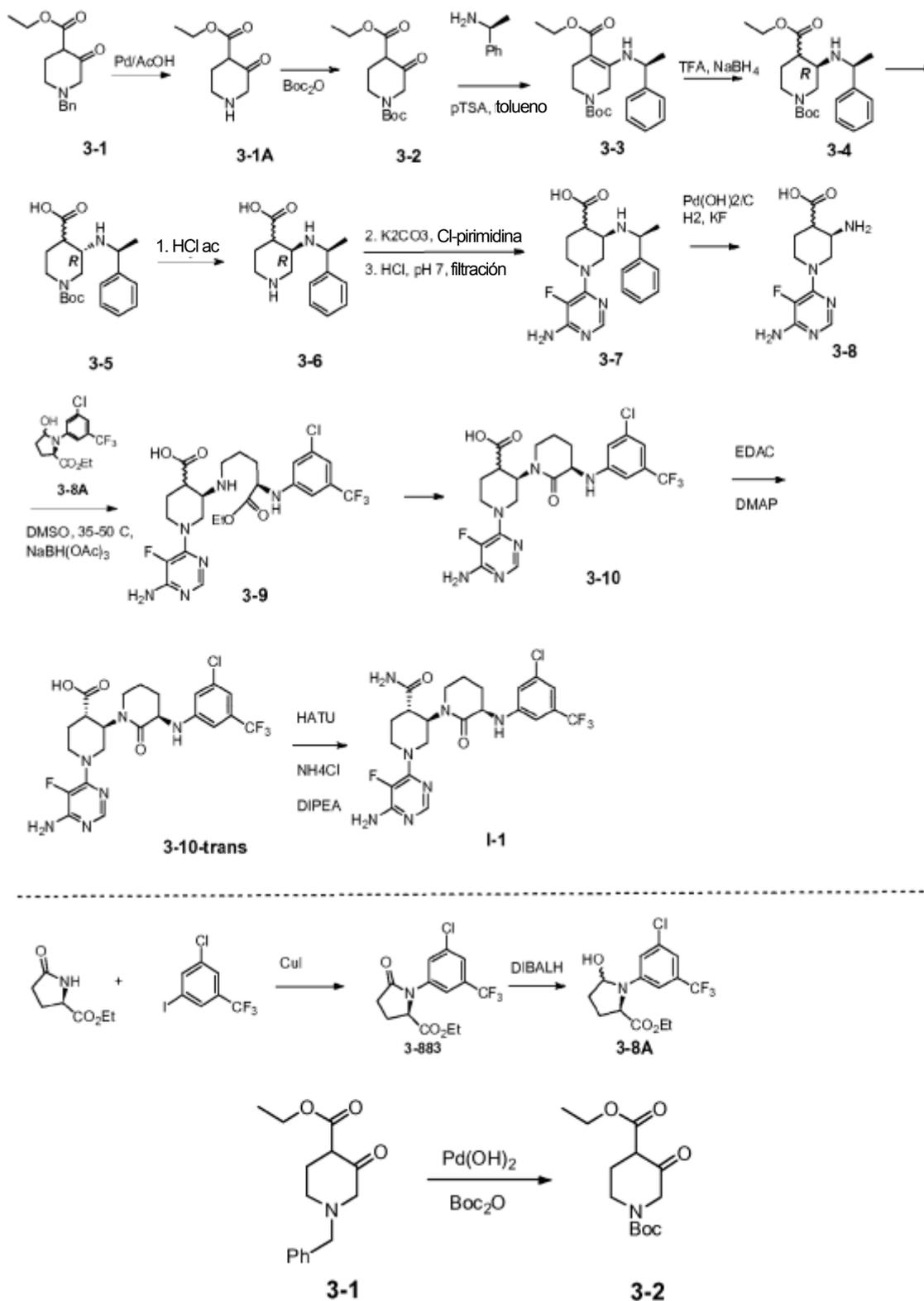
15 (3R,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros del compuesto 14 se separó en tres picos mediante SFC (IA (2 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 1 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del
20 título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 530,1 (M+1) @ 1,20 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (br. s., 1H), 6,98 (s, 1H), 6,96 (s, 1H), 6,73 - 6,88 (m, 2H), 6,57 (s, 2H), 6,54 (d, J= 7,78 Hz, 1H), 4,05 - 4,35 (m, 4H), 3,37 (t, J= 6,15 Hz, 2H), 3,12 (br. s., 1H), 2,94 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,09 (sxt, J= 5,80 Hz, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,56 - 1,73 (m, 1H), 1,36 - 1,52 (m, 1H).

Ejemplo 3

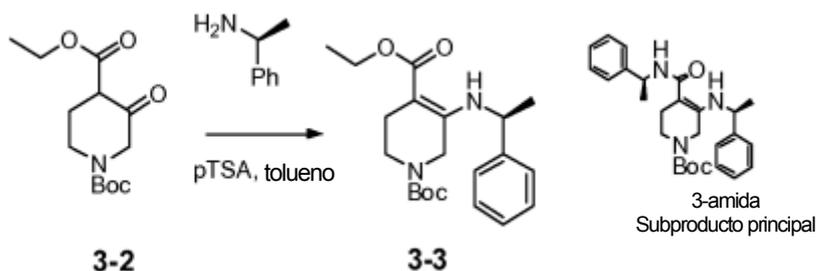
25 Síntesis alternativa de (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida.

30 Además de los métodos descritos en el ejemplo 2, (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida (compuesto I-1) también se sintetizó de acuerdo con el esquema 6.

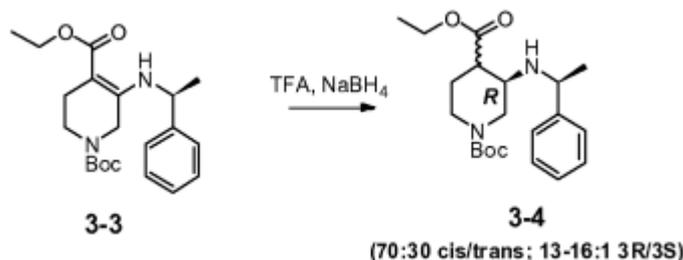
Esquema 6



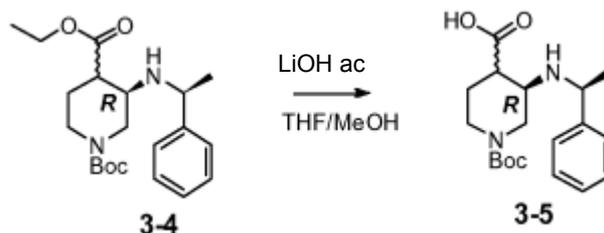
1-terc-butil 4-etil 3-oxopiperidina-1,4-dicarboxilato 3-2. A una solución de 3-1 (5,0 kg, 19,1 mol, 1,0 equiv) en EtOH (50 L) en N_2 se añadió $(\text{Boc})_2\text{O}$ (4,2 kg, 19,1 mol, 1,0 equiv), Et_3N (1,9 kg, 19,1 mol, 1,0 equiv) y Pd(OH) $_2$ /C al 10 % (250 g, 10 % p/p). Después de evacuar y rellenarse con hidrogenación tres veces, la mezcla se agitó en 1 atm de hidrógeno a 50 °C durante 15 horas. LC-MS indicó el consumo completo de 3-1. Después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, el catalizador se filtró a través de una capa de celite y se lavó con EtOH (2,5 L). El filtrado se concentró al vacío para producir 3-2 crudo (5,2 kg) como un aceite, que se usó en la próxima etapa sin purificación adicional.



(S)-1-terc-butil 4-etil 3-((1-feniletíl)amino)-5,6-dihidropiridina-1,4 (2H)-dicarboxilato (3-3). En un reactor de 100 L equipado con un aparato de Dean-Stark se cargó tolueno (20 L), el compuesto 3-2 crudo (5,2 kg, 19,1 mol, 1,0 equiv) enjuagado con tolueno (30 L), pTSA (329 g, 0,2 mol, 0,01 equiv), y S-(-)- α -metilbencilamina, 95 kg, 16,2 mol, 0,85 equiv). La mezcla se calentó a reflujo con un relleno de nitrógeno y el agua se eliminó a través de Dean-Stark. Después de 18 horas, LC-MS indicó el consumo completo de 3-2. La mezcla se enfrió después a la temperatura ambiente. Los compuestos insolubles se retiraron mediante filtración, y el filtrado se concentró al vacío hasta la sequedad para producir 3-3 crudo como un aceite espeso. Este producto crudo se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional. Del 3 al 10 % del subproducto de amida formado en esta reacción y su estructura se asignó tentativamente basados en los datos de LC-MS.

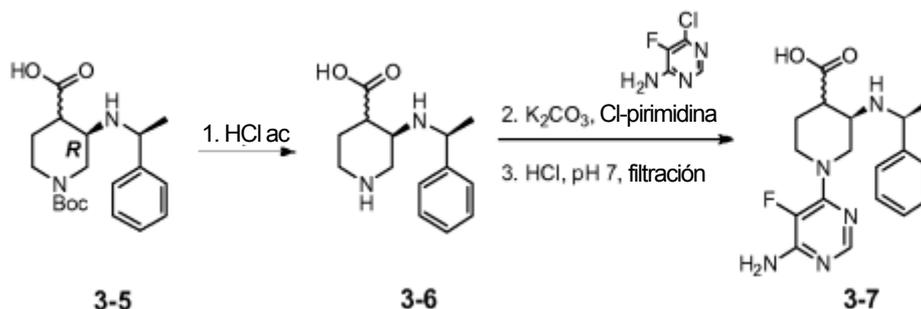


(3R)-1-terc-butil 4-etil 3-(((S)-1-feniletíl)amino)piperidina-1,4-dicarboxilato (3-4). A un reactor de 100 L cargado con NaBH₄ (1,16 kg, 30,5 mol, 2,0 equiv) y THF anhidro (60 L) en nitrógeno se añadió TFA (10,5 kg, 92 mol, 6,0 equiv) lentamente durante 30 min a la vez que se mantuvo la temperatura a 0~5 °C. La mezcla se enfrió después a -45 °C. En un reactor de separación, el producto 3-3 crudo se disolvió en acetonitrilo anhidro (30 L), que se añadió lentamente a la solución anterior de NaBH₄/TFA a la vez que se mantuvo la temperatura interna entre -45~-30 °C. La mezcla se agitó a -45 °C durante 1 hora, después de dicho tiempo, la HPLC indicó el consumo completo del compuesto 3-3. La mezcla se diluyó lentamente con agua helada (50 kg) y la mezcla se calentó después a 10 °C. El producto se extrajo con EtOAc (2 x 40 L) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de NaHCO₃ (20 L). El pH de la solución acuosa fue ~8. Las capas orgánicas se secaron (Na₂SO₄) y concentraron al vacío casi hasta la sequedad para producir un residuo que después se llevó a una mezcla azeotrópica con MeOH (10 L x 3) para eliminar el exceso de EtOAc. Al final, se obtuvo una solución de 10 L de 3-4 crudo en MeOH, que se usó directamente en la etapa posterior sin purificación adicional. ESI-MS (M+H-1)⁺: 377,2. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7,31-7,22 (m, 5H), 4,20 (q, 2H), 4,11-3,86 (m, 3H), 3,15 (s, 1H), 3,00-2,90 (m, 2H), 2,64 (d, 2H), 1,87-1,85 (m, 1H), 1,68 (s, 1H), 1,50-1,25 (m, 15H).

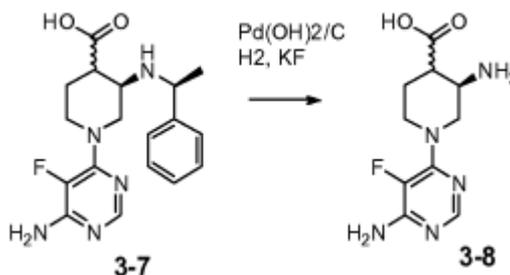


Ácido (3R)-1-(terc -butoxicarbonil)-3-(((S)-1-feniletíl)amino)piperidina-4-carboxílico (3-5). Un reactor de 100 L se cargó con THF/MeOH (1:1, 80 L), se añadió una solución de LiOH·H₂O (2,5 kg, 60 mol, 4,0 equiv) en agua (10 L) y una solución de 3-4 crudo en MeOH (10 L) de la etapa anterior. La mezcla resultante se agitó a 22 °C durante 18 horas, a cuyo tiempo LC/MS indicó el consumo completo del material de partida 3-4. La solución se diluyó con MTBE (40 L) y se agitó durante 20 min. La capa acuosa se separó, se enfrió a 0 °C y se neutralizó con solución de HCl 3N a pH entre 7-8, a la vez que se mantuvo la temperatura interna por debajo de 10 °C. La solución se lavó con DCM (5 x 30 L) o hasta que LC/MS indicó que no quedaban restos del producto 3-5 en la capa acuosa. Las capas orgánicas combinadas se concentraron al vacío hasta la sequedad, se suspendieron en EtOAc y éter de petróleo (2:1, 10 L) y se agitaron durante 2 horas, los sólidos se filtraron, se lavaron con éter de petróleo (5 L) y se secaron al vacío a 50 °C durante 18 horas para producir el producto (3,5 Kg, 53 % de rendimiento) como un sólido con 95 % de pureza. El compuesto

3-5 es una mezcla de ~30:70 trans/cis en C-4 y ~93:7R:Sat C-3. El rendimiento promedio en general de 3-1 es 43-55 %. ESI-MS (M+H-1)⁺: 349,2. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,22-8,06 (m, 5H) 4,11 (m, 1H), 3,86-3,82 (m, 1H), 3,59-3,56 (m, 1H), 2,79-2,65 (m, 1H), 3,22- 2,62 (m, 2H), 2,06 - 2,16 (m, 12H).

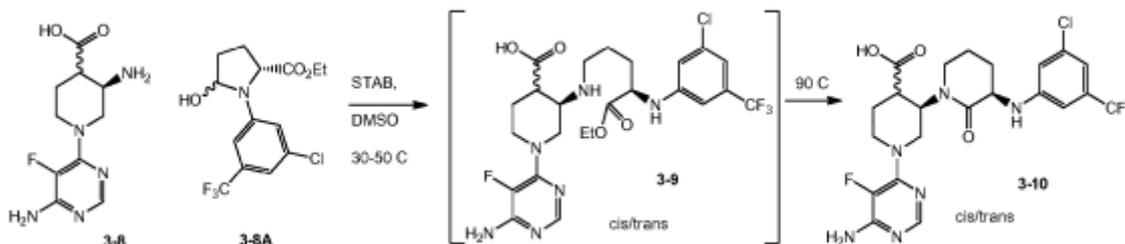


5 Ácido (3R)-1-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-(((S)-1-feniletil)amino)piperidina-4-carboxílico (3-7). Un reactor de 50 L se cargó con 10 L de HCl 2 N y 3-5 (850 g, 2,44 mol, 1,0 equiv). La mezcla se calentó a 30 °C y se agitó durante 2 horas, a cuyo tiempo la HPLC indicó el consumo completo de 3-5 inicial. La solución se diluyó con MTBE (4 L) y se agitó durante 20 min, las capas se separaron y a la capa acuosa se le añadió K₂CO₃ sólido (660 g) durante 1 hora a pH ~7. Se añadió K₂CO₃ adicional (660 g, 4,8 mol, 2,0 equiv) seguido de 6-cloro-5-fluoropirimidin-4-ilamina (360 g, 2,44 mol 1,0 equiv) y 1,4-dioxano (5 L). La mezcla se calentó hasta reflujo suave a 100 °C y se agitó a esta temperatura durante 16 horas. La HPLC indicó <2 % del compuesto 3-6 restante. La mezcla se lavó con DCM (2 x 5 L) y las soluciones orgánicas de lavado se descartaron. La capa acuosa se trató con carbono activo (425 g) mediante agitación de la suspensión durante 1 hora a 30 °C seguido por filtración a través de diatomita. Este tratamiento con carbono activo se repitió. La solución acuosa resultante se neutralizó a pH ~7 con HCl concentrado, y se agitó a 22 °C durante 3 horas, la suspensión resultante se filtró y la torta húmeda se lavó con 1,4-dioxano/agua (1:1, 1,2 L), se secó al vacío a 50 °C durante 18 horas hasta que KF ~0,5 % de producto 3-7 se obtuvo como un sólido de color blanco pálido (690 g, 81 % de rendimiento) con pureza de 98,6 %. El producto contiene una mezcla de los isómeros cis/trans 1:9 en las posiciones C3 y C4. ESI-MS (M+H-1)⁺: 460,2. ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 8,49 (d,J= 2,01 Hz, 1H), 8,21-8,14 (m, 5H) 4,94-4,90 (m, 1H), 4,63 (d,J= 11,55 Hz, 1H), 4,42 (m, 1H), 4,03 (m, 2H), 3,59 - 3,72 (m, 3H), 2,84 - 2,93 (m, 1H), 2,20 - 2,31 (m, 1H), 2,15 (d,J= 6,78 Hz, 3H).



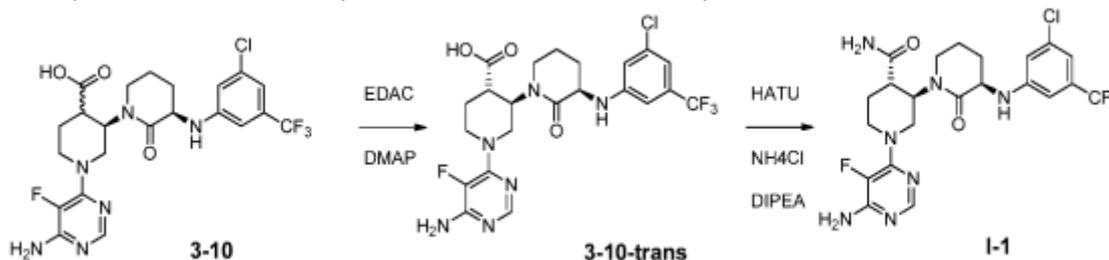
25 Ácido (3R)-3-amino-1-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)piperidina-4-carboxílico (3-8). En una reacción de 10 L se cargaron en N₂, i-PrOH (3,5 L), H₂O (3,5 L), 3-7 (1,0 equiv, 0,97 mol, 350 g), fluoruro de potasio monohidrato (290 g, 3,0 eq, 3,0 mol) y 35 g de Pd(OH)₂/C al 20 % (10 % v/p). Después de evacuar/rellenar con hidrógeno tres veces, la mezcla se calentó a 40-50 °C y se agitó vigorosamente a esa temperatura en 1 atmósfera de hidrógeno. Después de 18 horas, LC/MS indicó que quedaba <1 % del material de partida 3-7. La mezcla se purgó con N₂ durante 20 min, se enfrió a 22 °C y se filtró. La torta húmeda y el filtrado contenían el producto y se procesaron separadamente.

30 El filtrado se concentró al vacío a 50 °C a un volumen de ~200 ml. Después de enfriar a 20 °C y agitar a esta temperatura durante 2 horas, se obtuvo una suspensión, y el sólido se filtró, se lavó con agua (400 ml) y se secó al vacío y a 50 °C para producir el producto 3-8 (65 g). La torta húmeda de la filtración de la reacción se agitó en HCl 1N (1 L) durante 2 horas para disolver el producto y el sólido catalizador restante se eliminó después mediante filtración. El filtrado ácido se neutralizó con LiOH sólido a pH ~7 para precipitar el producto 3-8. El producto se lavó con agua (200 ml), se secó al vacío y a 50 °C para producir 120 g de producto. Un total de 185 g de producto se obtuvo con 98,7 % de pureza y en 75 % de rendimiento basado en H NMR. Todos los licores madre se combinaron y concentraron a un volumen de ~400 ml lo que dio como resultado una suspensión, la filtración, el lavado con agua y el secado produjo 64 g adicionales de sólido con ~50 % de pureza. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7,77 (s, 1H) 4,12 (d,J= 14,05 Hz, 1H), 4,01 (d,J= 13,05 Hz, 1H), 3,26 (d,J= 13,80 Hz, 1H), 2,99 - 3,10 (m, 1H), 2,64 - 2,73 (m, 1H), 1,98 (dd,J= 3,39, 14,18 Hz, 1H), 1,74 - 1,87 (m, 1H).



Ácido ((3R,3'R)-1'-(terc-butoxicarbonil)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico (3-10). A una solución de 3-8 (440 g, 1,9 mol, 1,0 equiv) en DMSO (10 L) se añadió 3-8A secuencialmente (640 g, 1,9 mol, 1,0 equiv) y triacetoxiborohidruro de sodio (STAB, 402,0 g, 3,8 mol, 2 equiv) y Et3N (, 190 g, 1,9 mol, 1,0 equiv). La mezcla se calentó a 50 °C y se agitó durante 3 horas para mostrar una conversión completa mediante HPLC al intermediario 3-9.

La solución se diluyó con MeOH (182 g, 5,7 mol, 3,0 eq.) para inactivar el exceso de STAB, y la reacción se calentó a 70~80 °C. Después de 16 horas, la HPLC indicó la formación de 22 % del producto 3-10 y la permanencia del 61 % del intermediario 3-9 y la HPLC quiral indicó ~3 % de un epímero de lactama. La mezcla se mantuvo a 70-80 °C durante otras 24 horas para producir 50 % de 3-10, 35 % de 3-9 y 7 % del epímero de lactama. Después de otras 40 horas de agitación, se formó 80 % de 3-10, quedó 4 % de 3-9, y el epímero de lactama aumentó a 14 %. La mezcla se enfrió a 22 °C, y se inactivó con solución de NH4Cl 2 N (5 L) para producir una mezcla en suspensión. Después de 30 minutos de agitación, la mezcla se filtró y la torta húmeda se lavó con agua (3 L), se secó al vacío y a 55 °C hasta que KF<0,1. El 3-10 crudo se obtuvo como un sólido de color marrón (850 g, 97,7 %); la HPLC quiral indicó 12,5 % del epímero de lactama. Este producto se usó directamente sin purificación adicional



Ácido (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico (3-10-trans). Un reactor de 10 L se cargó en N2 con 3-10 (850 g, 1,9 mol, 1,0 equiv) en DMF (4,25 L, 5 v/p) para producir una solución clara, se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP 116 g, 0,95 mol, 0,5 equiv) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI, 36,5 g, 0,19 mol, 0,1 equiv). Después la mezcla se agitó a 15 a 22 °C durante aproximadamente 1 hora, se añadió EDCI adicional (36,5 g, 0,19 mol, 0,1 equiv) y se agitó durante 1 hora más. La HPLC indicó una mezcla de trans/cis 69:1. El producto 3-10-trans no se aisló y se convirtió al compuesto I-1 en un recipiente. ¹H NMR (300 MHz, DMSO_{d6}): δ 1,47-1,55 (m, 1H), 1,63-1,68 (m, 1H), 1,81-1,87 (m, 1H), 1,90-1,97 (m, 1H), 2,93-3,19 (m, 1H), 3,16-3,23 (m, 1H), 3,33-3,45 (m, 2H), 4,07-4,33 (m, 3H), 6,80 (m, 1H), 6,94-6,98 (m, 1H), 7,10-7,16 (m, 2H), 7,91 (s, 1H).

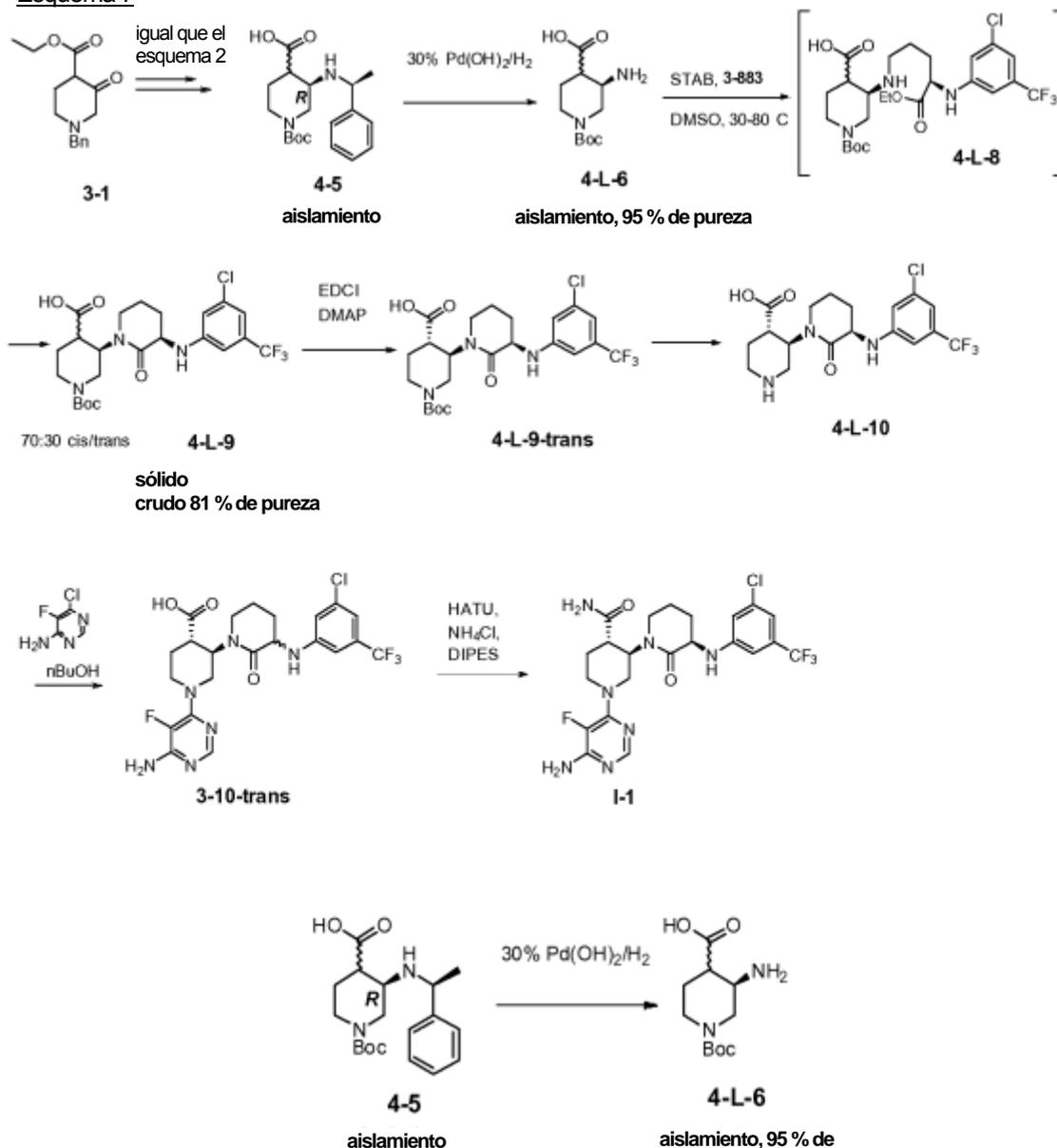
(3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida (I-1). La mezcla de reacción anterior, se cargó a 22 °C, con O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HATU, 600 g, 1,9 mol, 1,0 equiv), N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 1,0 kg, 9,5 mol, 5,0 equiv) y finalmente NH₄Cl (260 g, 5,7 mol, 3,0 equiv). La mezcla resultante se agitó a 15 °C durante 1 hora, la HPLC indicó el consumo completo de 3-10-trans, la mezcla se vertió en salmuera (25 L) y se extrajo con EtOAc (2 x 2L). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera (2 x 2L) y se concentraron al vacío por debajo de 45 °C hasta la sequedad para dar como resultado un I-1 crudo, que se purificó mediante cromatografía con EtOAc/éter de petróleo/MeOH (1:1:0 a 50:50:10) para producir tres fracciones, que contenían 316 g, 98,8 % de pureza química y 10,8 % de epímero, 160 g, 82,3 % de pureza química y 17,5 % de epímero y 180 g, 61 % de pureza y 11,3 % de epímero, respectivamente. Las dos primeras fracciones anteriores se combinaron y se purificaron adicionalmente mediante prep-HPLC para producir 200 g de producto con >99 % de pureza y <1 % de epímero. ¹H NMR (400 MHz, DMSO_{d6}): δ 1,48-1,53 (m, 1H), 1,66-1,69 (m, 1H), 1,77-1,79 (m, 3H), 2,11-2,16 (m, 1H), 2,80-2,88 (m, 2H), 3,11 (s, 1H), 3,42-3,48 (m, 1H), 4,0-4,25 (m, 4H), 6,58 (s, 3H), 6,80-6,85 (d,J=10,2, 2H), 6,95 (s, 2H), 7,40 (s, 1H), 7,77 (s, 1H).

Ejemplo 4

Síntesis alternativas de (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida.

Además de los métodos descritos en los ejemplos 2 y 3, el compuesto (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida (compuesto I-1) se sintetizó, además, de acuerdo con el esquema 6.

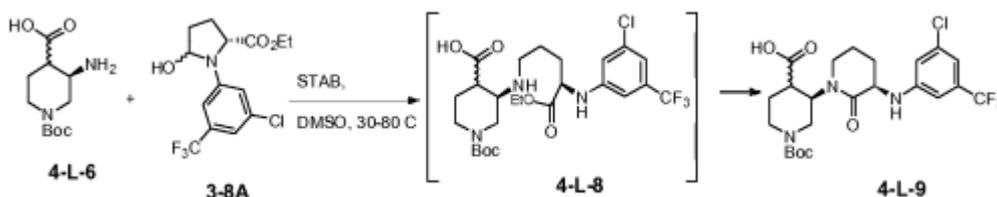
Esquema 7



5

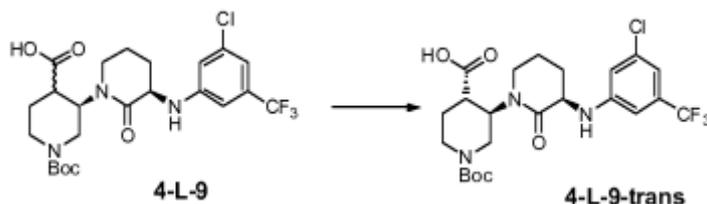
10

Ácido (3R)-3-amino-1-(terc -butoxicarbonil)piperidina-4-carboxílico (4-L-6). Un reactor de 10 L se cargó en nitrógeno con el compuesto 4-5 (100 g, 0,287 mol), MeOH (6 L, 60 v/p) y 10 g de Pd(OH)₂/C 20 %. El reactor se evacuó/rellenó con hidrógeno tres veces y la mezcla se calentó a 40-50 °C mientras se agitaba a 3 Mpa de hidrógeno durante 40 horas. LC/MS indicó el consumo completo del material de partida 4-5. La mezcla se enfrió a 22 °C y se filtró, y el filtrado se concentró al vacío hasta la sequedad para producir un producto sólido. Este producto crudo se llevó a suspensión en EtOH (500 ml) a 22 °C durante 2 horas, se filtró y secó al vacío a 50 °C para producir un 85 % de rendimiento del producto 4-L-6 (60 g, 0,245 mol) como un sólido blanco.

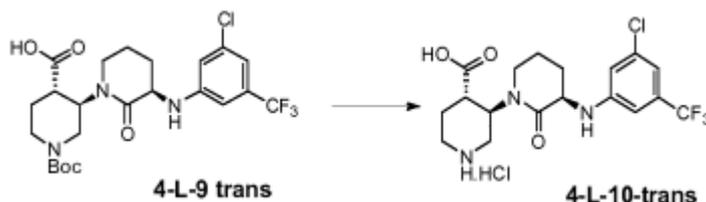


Ácido (3R)-1-(terc-butoxicarbonil)-3-(((R)-4-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-5-etoxi-5-oxopentil)amino)piperidina-4-carboxílico (4-L-8). A una solución de 4-L-6 (48,4 g, 0,197 mol) en DMSO (450 ml) se añadió Et₃N (20,2 g, 0,199 mol, 1 equiv), 3-8A (67,4 g, 0,199 mol, 1 equiv) y triacetoxiborohidruro de sodio (STAB, 84,8 g, 0,40 mol, 2,0 equiv). La mezcla se calentó a 50 °C durante 30 min y se agitó a esa temperatura durante 3 horas. LC/MS indicó el consumo de la mayor parte del material de partida 4-L-6 y la formación de 4-L-8.

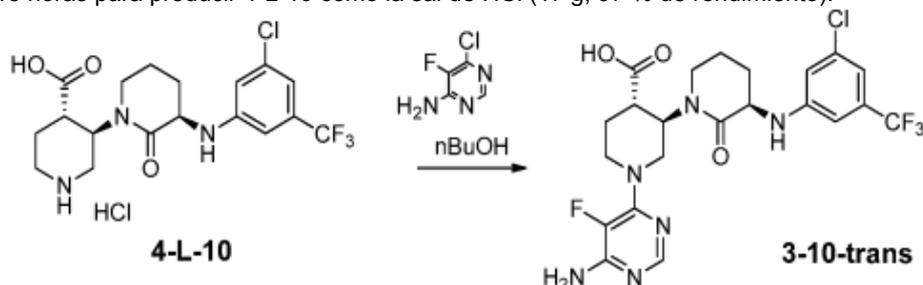
La reacción se inactivó mediante la adición de EtOH (35 ml) y la agitación a 50 °C durante 30 min. La mezcla se calentó a 75-85 °C durante 3 días. La mezcla se enfrió a 18 °C y se transfirió lentamente al agua (6 L) con agitación vigorosa para producir una suspensión. Después de 2 horas, los sólidos se filtraron y lavaron con agua (3 x 3 L), se secaron al vacío a 60-70 °C durante 24 horas para producir 4-L-9 (114 g) como un sólido de color marrón. El sólido se usó directamente en la etapa posterior.



Ácido (3R,3'R,4'S)-1'-(terc-butoxicarbonil)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico (4-L-9-trans). A una solución de 4-L-9 crudo (100 g), en DMF (500 ml) se añadió 4-dimetilaminopiridina (11 g, 0,09 mol, 0,5 equiv) y se agitó a 20 °C durante 10 min. Se añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (7,0 g, 0,036 mol, 0,2 equiv) y la reacción se agitó a 20 °C durante 3 horas. HPLC indicó una relación de 57:43 de la mezcla cis/trans y se añadió EDAC adicional (3,5 g, 0,018 mol, 0,1 equiv). Después de 5 horas, la HPLC indicó conversión completa a 4-L-9-trans. La mezcla se transfirió al agua (2,25 L) lentamente y la mezcla se extrajo con EtOAc (2 x 500 ml), y las capas orgánicas se lavaron con salmuera (500 ml) y agua (500 ml), se concentraron al vacío hasta la sequedad para producir 4-L-9-trans crudo (100 g) como un sólido de color marrón. El crudo se disolvió en EtOAc (135 ml) a 60 °C y después se enfrió a 20 °C durante 1 hora seguido de la adición de 50 ml de éter de petróleo. La mezcla se envejeció durante 2 horas. Los sólidos se filtraron y lavaron con EtOAc/éter de petróleo 3:1 (50 ml), se secaron al vacío a 50 °C durante 16 horas para producir 4-L-9-trans (23 g, 22 % de rendimiento con 99 % de pureza). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 6,94 (s, 2H), 6,81 (s, 1H), 6,54 - 6,61 (m, 1H), 3,99 - 4,08 (m, 1H), 3,42 - 3,38 (m, 2H), 2,07 - 2,16 (m, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,39 (s, 9H).



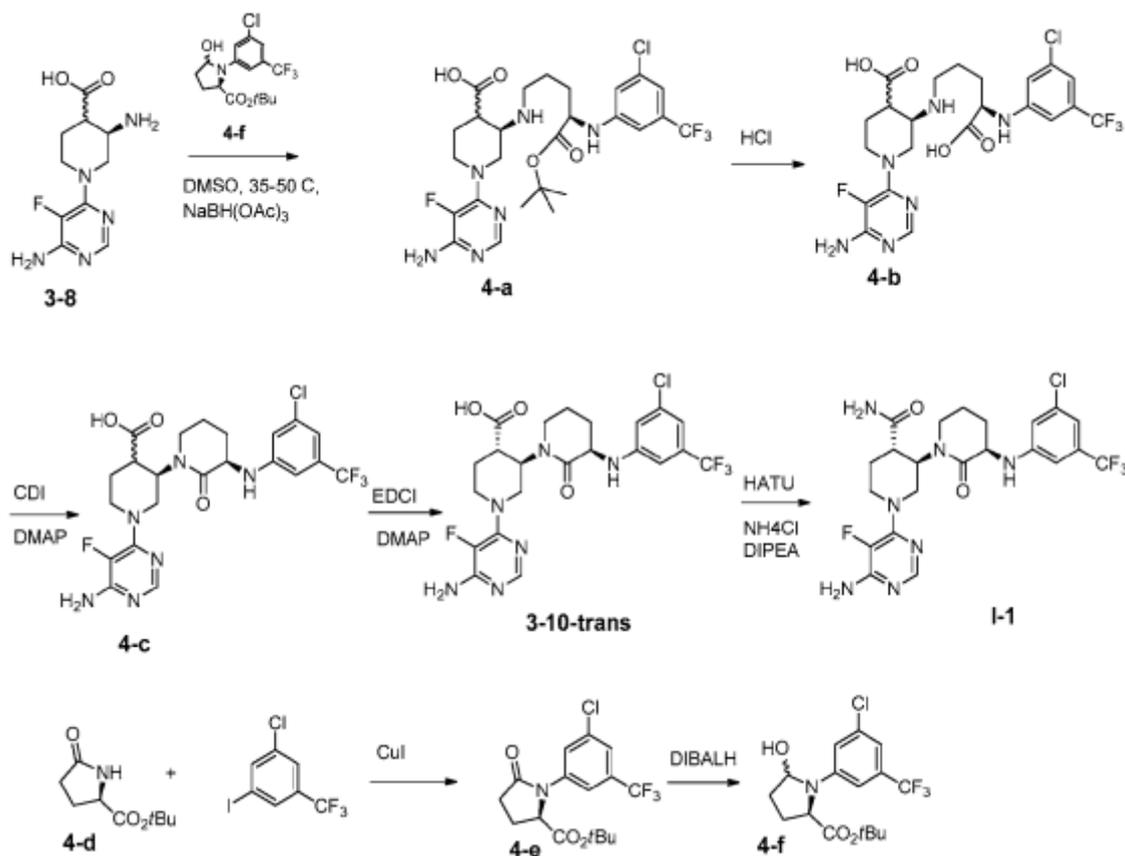
Hidrocloruro del ácido (3R,3'R,4'S)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico (4-L-10 trans). A una solución de HCl 0,5 N en EtOAc (76 ml) se añadió 4-L-9 trans (20 g, 38 mmol) y se calentó a 20 °C durante 18 horas para producir una suspensión. El sólido se filtró, se lavó con EtOAc (5 ml) y se secó al vacío a 45 °C durante 18 horas para producir 4-L-10 como la sal de HCl (17 g, 97 % de rendimiento).



Ácido (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico (3-10-trans). Una solución de 4-L-10 (2,0 g, 4,38 mol), 6-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-ilamina (711 mg, 4,82 mmol, 1,1 equiv), DIPEA (1,52 ml, 8,77 mol, 2 eq.) en 40 ml de nBuOH se calentó a 130-140 °C durante 72 horas. La mezcla se enfrió a 22 °C y se concentró al vacío para producir un residuo que se purificó en columna para producir 3-10-trans (1,1 g, 47 %). También se observó una cantidad relativamente menor del epímero ácido (3S,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico. El intermediario 3-10-trans puede convertirse en el compuesto I-1 por medio del procedimiento descrito anteriormente.

El compuesto I-1 se sintetizó, además, de acuerdo con el esquema 8.

Esquema 8



La síntesis de (R)-terc-butil-1-(3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-5-oxopirrolidina-2-carboxilato 4-e se sintetizó mediante el uso de un procedimiento similar como en Phillips, D. P.; Zhu, X. -F.; Lau, T. L.; Yang, K.; Liu, H. Tetrahedron Letters, 2009, 50, 7293, de manera que el (S)-metil 5-oxopirrolidina-2-carboxilato y 1-cloro-4-yodobenceno se sustituyeron por el (R)-terc-butil 5-oxopirrolidina-2-carboxilato y 1-cloro-3-yodo-5-(trifluorometil)benceno.

(2R)-terc- butil 1-(3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-5-hidroxi-pirrolidina- 2-carboxilato. Una solución anhidra de 4-e (11 g, 30 mmol) en Me-THF (100 ml) se enfrió a -35 °C en una atmósfera de nitrógeno. Una solución de DIABL-H (5,9 g, 42 mmol) en tolueno (42 ml) se añadió por goteo a la vez que se mantuvo la temperatura a - 35 °C. La reacción se monitoreó mediante HPLC y al terminar se añadió una solución de sal de la Rochelle IN (100 ml) a la vez que se mantuvo la temperatura de la reacción por debajo de 0 °C. La fase orgánica se separó, se lavó con sal de la Rochelle IN (50 ml x 3) y se separó, se diluyó con Et3N (4 ml), se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío para producir 4-f (8,3 g) como un aceite.

Ácido (3R)-1-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-(((R)-5-(terc-butoxi)-4-((3-cloro-5-(trifluorometil) fenil)amino)-5-oxopentil)amino)piperidina-4-carboxílico. Una solución de 4-f (37,4 g, 0,146 mmol) en DMF (700 ml) se trató con 3-8 (40,2 g, 0,11 mmol), Et3N (10,1 g, 0,1 mmol) STAB (42,4 g, 0,2 mmol) y la mezcla se calentó a 55 °C durante 5 horas. La reacción se diluyó con agua (2,5 L), se extrajo con EtOAc (500 ml x 3), las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con salmuera, se separaron, secaron (Na_2SO_4) y concentraron al vacío para producir 4-a (40,2 g) como un sólido que se usó sin ninguna purificación adicional.

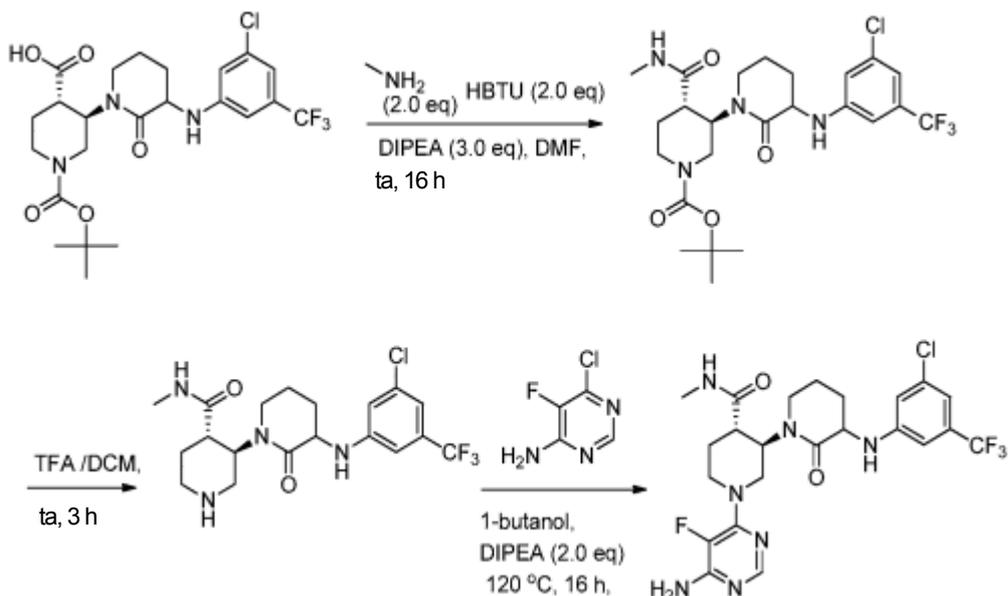
Ácido (3R)-1-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-(((R)-4-carboxi-4-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)butil) amino)piperidina-4-carboxílico. A una solución de HCl 5N (250 ml) se añadió éster t-butílico 4-a y la suspensión se calentó a 55 °C durante 5 horas a la vez que la hidrólisis se monitoreó mediante HPLC. Tras la formación completa del producto el agua se eliminó al vacío resultando en un sólido 4-b que se secó al vacío y se usó sin ninguna purificación adicional.

Ácido (3R,3'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-(((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxílico. A una solución de ácido 4-b (55 g, 0,1 mol) en DMF (500 ml) se añadió DIEA (64,5 g, 0,5 mol), CDI (32,5 g, 0,2 mol) a 0 °C. La solución se agitó durante 1,5 horas a 0 °C, se diluyó con agua (3 L), se ajustó a pH 3 con HCl y se extrajo con EtOAc (2 L x 3). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron (Na_2SO_4) y concentraron al vacío para producir 4-c (48 g).

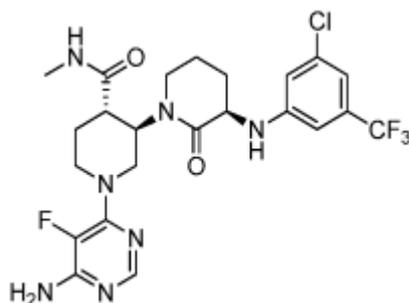
Las etapas restantes para el compuesto I-1 se completan por medio de procedimientos descritos anteriormente.

Ejemplo 5

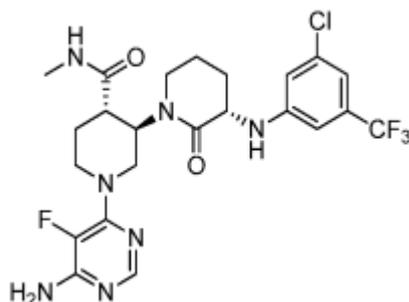
Síntesis de trans-terc-butil 3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(metilcarbamoil)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1'-carboxilato.



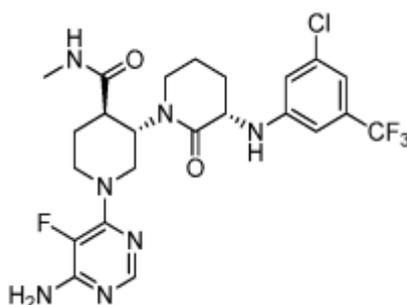
5 Síntesis de trans-terc-butil 3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil) amino)-4'-(metilcarbamoil)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-1'-carboxilato. Se usó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir el material crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con NH₃.H₂O al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (360 mg, rendimiento: 67 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 544,18. HPLC: (214 nm: 100,0 %, 254 nm: 100,0 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) (mezcla de isómeros) δ: 7,69-7,68 (m, 1H), 6,78 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,71 (s, 1H), 4,39-4,36 (m, 2H), 4,09-4,03 (m, 1H), 3,53-3,31 (m, 3H), 3,20-3,10 (m, 1H), 2,99-2,92 (m, 1H), 2,55 (s, 3H), 2,28-2,19 (m, 1H), 1,96-1,77 (m, 5H), 1,68-1,58 (m, 1H).



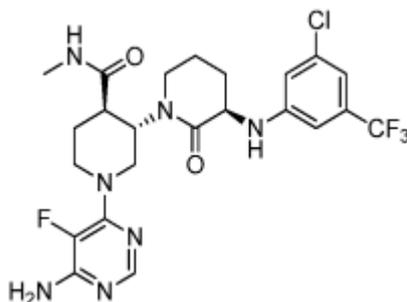
15 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N-metil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en dos picos mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), 50 % 1:1 IPA:metanol (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 2 se purificó adicionalmente mediante separación por SFC (AD-H (2 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,15 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 544,1 (M+1) @ 1,24 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,72 - 7,85 (m, 2H), 6,92 (s, 2H), 6,81 (s, 1H), 6,43 - 6,64 (m, 3H), 4,34 (br. s., 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 1H), 3,93 - 4,19 (m, 2H), 3,37 - 3,49 (m, 1H), 3,22 - 3,30 (m, 1H), 3,13 (br. s., 1H), 2,84 (t, J= 12,05 Hz, 2H), 2,57 (d, J= 4,52 Hz, 3H), 2,13 (qd, J= 6,05, 12,45 Hz, 1H), 1,60 - 1,89 (m, 4H), 1,40 - 1,58 (m, 1H).



(3S,3'R,4'5)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N-metil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en dos picos mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), 50 % 1:1 IPA:metanol (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 2 se purificó adicionalmente mediante separación por SFC (AD-H (2 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,15 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 544,1 (M+1) @ 1,24 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,83 (q, J= 4,60 Hz, 1H), 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 6,97 (d, J= 6,78 Hz, 2H), 6,81 (s, 1H), 6,58 (s, 2H), 6,53 (d, J= 7,78 Hz, 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 2H), 3,90 - 4,19 (m, 2H), 3,14 (br. s., 1H), 2,92 (br. s., 1H), 2,74 - 2,90 (m, 1H), 2,55 (d, J= 4,52 Hz, 3H), 2,00 - 2,18 (m, 1H), 1,74 - 1,89 (m, 3H), 1,56 - 1,74 (m, 1H), 1,34 - 1,50 (m, 1H).

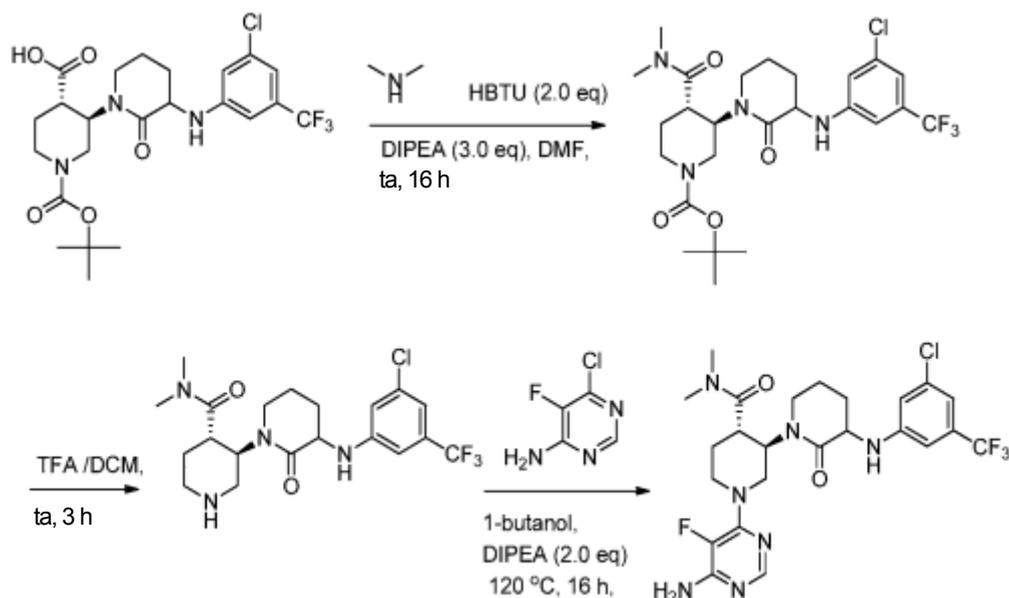


(3S,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N-metil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en dos picos mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), 50 % 1:1 IPA:metanol (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 1 se purificó adicionalmente mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), MeOH al 30 % (DEA al 0,15 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 544,1 (M+1) @ 1,23 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,72 - 7,85 (m, 2H), 6,92 (s, 2H), 6,81 (s, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,54 (d, J= 7,53 Hz, 1H), 4,23 (d, J= 13,30 Hz, 1H), 4,15 (dd, J= 3,26, 12,30 Hz, 1H), 4,08 (td, J= 7,06, 10,48 Hz, 1H), 3,36 - 3,47 (m, 1H), 3,23 - 3,30 (m, 1H), 3,13 (br. s., 1H), 2,84 (t, J= 11,80 Hz, 2H), 2,57 (d, J= 4,52 Hz, 3H), 2,13 (qd, J= 6,17, 12,61 Hz, 1H), 1,62 - 1,91 (m, 4H), 1,42 - 1,57 (m, 1H).

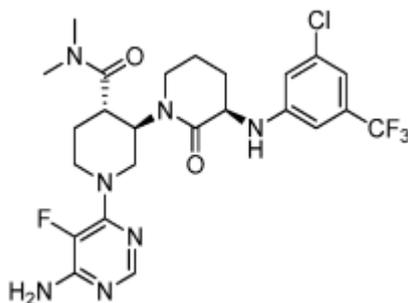


trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N-metil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en dos picos mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), 50 % 1:1 IPA:metanol (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 1 se purificó adicionalmente mediante SFC (AD-H (2 x 15 cm), MeOH al 30 % (DEA al 0,15 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 544,1 (M+1) @ 1,24 min. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 544,1 (M+1) @ 1,24 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,80 - 7,89 (m, 1H), 7,72 - 7,80 (m, 1H), 6,97 (d, J= 6,53 Hz, 2H), 6,81 (s, 1H), 6,58 (s, 2H), 6,53 (d, J= 7,78 Hz, 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 2H), 3,89 - 4,19 (m, 2H), 3,13 (br. s., 1H), 2,74 - 3,02 (m, J=12,42, 12,42 Hz, 2H), 2,55 (d, J= 4,52 Hz, 3H), 2,08 (qd, J= 5,97, 12,20 Hz, 1H), 1,81 (td, J= 6,24, 12,36 Hz, 3H), 1,56 - 1,74 (m, 1H), 1,33 - 1,51 (m, 1H).

Ejemplo 6



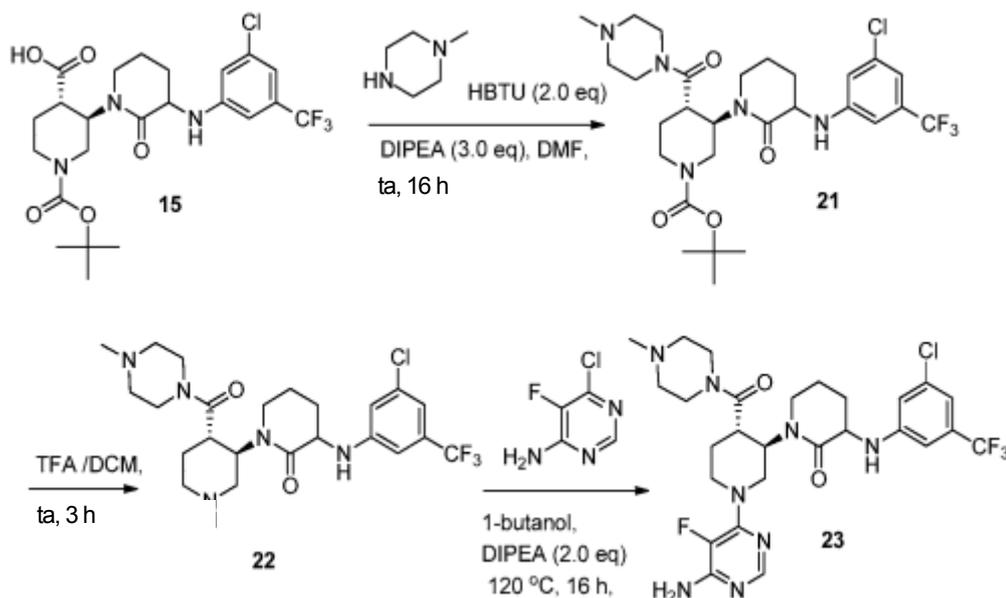
5 Síntesis de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N -dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. Se usó un procedimiento similar como el descrito para la síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir el material crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con TFA al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (45 mg, rendimiento: 90 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 558,0. HPLC: (214 nm: 98,2 %, 254 nm: 100,0 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,77 (s, 1H), 6,92-6,89 (m, 1H), 6,83-6,81 (m, 1H), 6,79 (s, 1H), 4,38-4,38 (m, 2H), 4,05-4,00 (m, 2H), 3,55-3,53 (m, 1H), 3,45-3,40 (m, 2H), 3,15-2,89 (m, 7H), 2,21-2,16 (m, 1H), 1,90-1,86 (m, 3H), 1,66-1,56 (m, 2H).



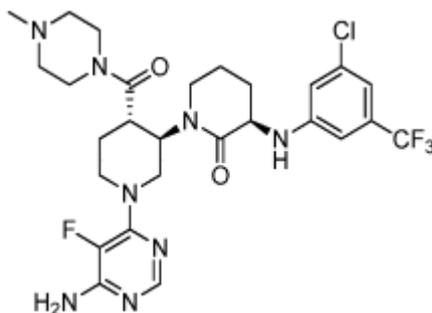
15 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N -dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. El compuesto del título se obtuvo a partir de la separación quiral de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil) amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC(2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después la mezcla resultante que contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ESI-MS (M+H)⁺: 558,0. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,92 (d,J= 1,76 Hz, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,72 (d,J= 7,78 Hz, 2H), 5,21 (d,J= 3,51 Hz, 1H), 4,70 (s, 2H), 4,45 (dd,J= 2,76, 12,80 Hz, 2H), 4,17 - 4,32 (m, 1H), 3,64 - 3,80 (m, 2H), 3,44 - 3,58 (s, 3H), 3,09 (s, 3H), 3,00 - 3,09 (m, 1H), 2,95 (s, 3H), 2,40 (dd,J= 5,52, 13,30 Hz, 1H), 1,63 - 1,99 (m, 3H), 1,26 - 1,43 (m, 1H).

5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC (2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después cada mezcla que contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ESI-MS (M+H)⁺: 558,0¹H NMR (400 MHz, (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,93 (d,J= 1,26 Hz, 1H), 6,93 (s, 1H), 6,69 (br. s., 2H), 5,06 (d,J= 4,27 Hz, 1H), 4,71 (s, 1H), 4,45 (d,J= 12,55 Hz, 2H), 4,16 - 4,26 (m, 1H), 3,66 - 3,81 (m, 2H), 3,54 - 3,64 (m, 1H), 3,40 - 3,54 (m, 2H), 3,01 - 3,10 (m, 4H), 2,95 (s, 3H), 2,37 (dd,J= 5,27, 13,05 Hz, 1H), 1,91 - 2,02 (m, 2H), 1,48 - 1,75 (m, 2H).

Ejemplo 7

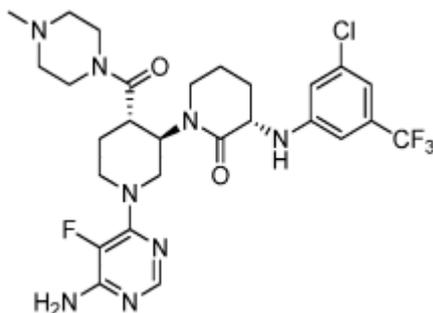


15 Síntesis de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-[1,3'-bipiperidin]-2-ona. Se usó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir 23 que se purificó mediante HPLC de fase inversa (MeOH/H₂O con NH₃.H₂O al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (100 mg, rendimiento: 70 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 613,24.¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,94 (s, 1H), 6,94 (s, 1H), 6,73-6,67 (m, 2H), 5,25-5,03 (m, 1H), 4,71 (s, 2H), 4,49-4,40 (m, 2H), 4,35-4,16 (m, 1H), 3,82-3,64 (m, 3H), 3,62-3,41 (m, 6H), 3,08-2,97 (m, 1H), 2,52-2,34 (m, 3H), 2,30-2,25 (m, 2H), 2,20 (s, 3H), 1,85-1,64 (m, 2H), 1,72-1,64 (m, 2H), 1,49-1,31 (m, 1H).

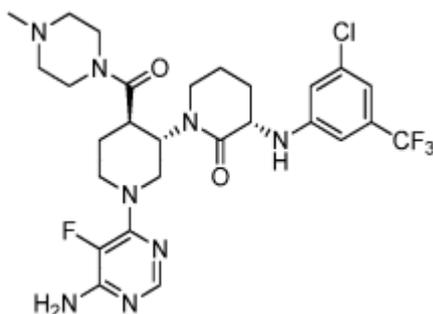


25 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-[1,3'-bipiperidin]-2-ona. El compuesto del título se obtuvo a partir de la separación quiral de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-etil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 23 mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC (2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después la mezcla resultante que contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ESI-MS (M+H)⁺: 613,2¹H

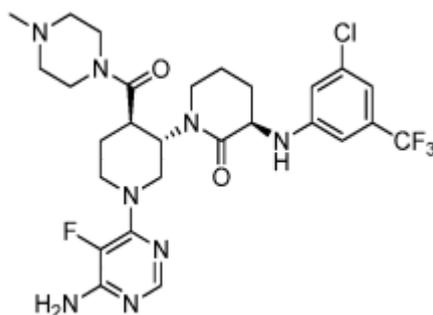
NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,95 (s, 1H), 6,83 - 6,97 (m, 3H), 4,50 - 4,68 (m, 2H), 4,28 - 4,40 (m, 1H), 3,66 - 3,91 (m, 8H), 3,30 - 3,52 (m, 4H), 3,14 (t, J= 12,42 Hz, 2H), 2,73 (br. s., 2H), 2,27 (dd, J= 5,65, 12,93 Hz, 1H), 1,83 - 2,05 (m, 2H), 1,54 - 1,79 (m, 2H).



- 5 (3S,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-[1,3'-bipiperidin]-2-ona. El compuesto del título se obtuvo a partir de la separación quiral de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-etil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 23 mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC (2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después la mezcla resultante que contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ESI-MS (M+H)⁺: 613,2.¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,91 - 7,99 (m, 1H), 6,84 - 6,97 (m, 3H), 4,57 (dd, J= 14,18, 19,70 Hz, 2H), 4,34 (br. s., 1H), 3,42 - 3,53 (m, 1H), 3,37 (d, J= 1,51 Hz, 3H), 3,05 - 3,19 (m, 1H), 2,86 (t, J=7,53 Hz, 1H), 2,68 - 2,78 (m, 2H), 2,26 (dd, J= 5,65, 12,93 Hz, 1H), 1,82 - 2,03 (m, 3H), 1,55 - 1,79 (m, 2H).

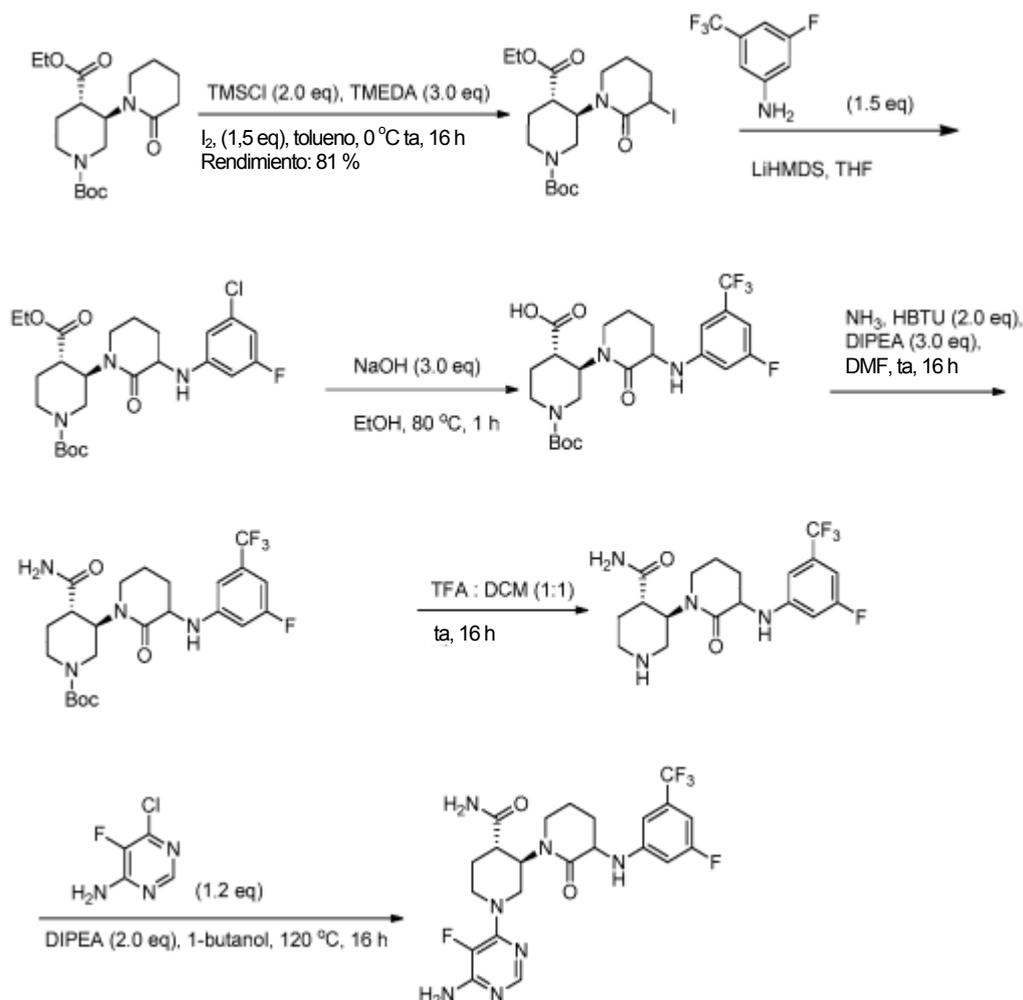


- 20 (3S,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-[1,3'-bipiperidin]-2-ona. El compuesto del título se obtuvo a partir de la separación quiral de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 23 mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC (2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después la mezcla resultante que contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ESI-MS (M+H)⁺: 613,2.¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,94 (s, 1H), 6,87 - 6,93 (m, 3H), 4,57 (dd, J= 14,18, 19,70 Hz, 1H), 4,34 (br. s., 1H), 3,43 - 3,51 (m, 1H), 3,36 - 3,38 (m, 2H), 3,13 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,86 (t, J= 7,53 Hz, 1H), 2,73 (br. s., 1H), 2,26 (dd, J= 5,65, 12,93 Hz, 1H), 1,96 - 2,03 (m, 1H), 1,83 - 1,94 (m, 1H), 1,51 - 1,75 (m, 1H).



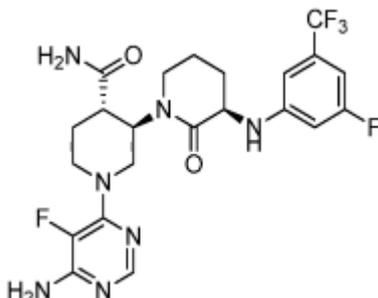
5 ((3R,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-4'-(4-metilpiperazina-1-carbonil)-[1,3'-bipiperidin]-2-ona. El compuesto del título se obtuvo a partir de la separación quiral de trans-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-etil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida
 10 23 mediante el uso de una separación quiral por SFC en dos etapas. En primer lugar, la mezcla se separó en dos picos que contenían una mezcla de dos diastereómeros ((3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida y (3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-N,N-dimetil-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida) mediante el uso de una columna ChiralPak IC (2 x 15 cm, metanol al 30 % p/0,1 DEA), y después cada mezcla que
 15 contenía un par de isómeros se separó adicionalmente en los enantiómeros individuales mediante el uso de una columna ChiralPak IA (2 x 15 cm, metanol al 30 % c/DEA al 0,1 % 100 bar). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 7,96 (br. s., 1H), 6,90 (br. s., 1H), 6,76 (d, J= 10,04 Hz, 2H), 4,60 (t, J= 14,06 Hz, 2H), 4,19 - 4,32 (m, 1H), 3,67 - 3,78 (m, 1H), 3,43 - 3,54 (m, 3H), 3,35 - 3,38 (m, 3H), 3,16 (t, J=12,42 Hz, 1H), 2,86 (t, J= 7,40 Hz, 2H), 2,79 (s, 3H), 2,32 (dd, J= 5,02, 12,80 Hz, 1H), 1,89 - 2,07 (m, 4H), 1,62 - 1,76 (m, 5H),

Ejemplo 8

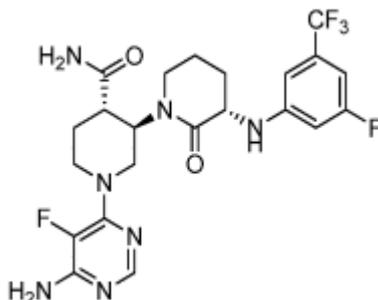


Síntesis de 1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. Se usó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-

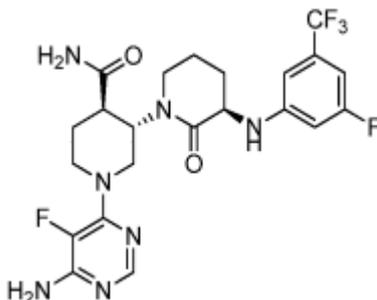
il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir el material crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con NH₃.H₂O al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (175 mg, rendimiento: 69 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 514,19. HPLC: (214 nm: 96,13 %, 254 nm: 96,53 %). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD)δ: 7,79-7,78 (m, 1H), 6,76 (s, 1H), 6,63-6,54 (m, 2H), 4,41-4,36 (m, 2H), 4,08-4,06 (m, 1H), 3,55-3,41 (m, 3H), 3,28-3,25 (m, 1H), 2,99-2,93 (m, 1H), 2,28-2,21 (m, 1H), 1,98-1,78 (m, 6H).



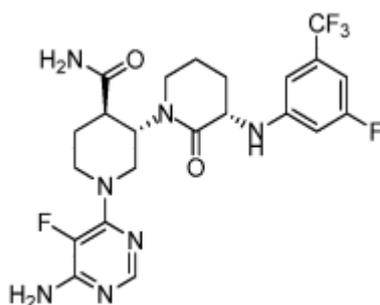
(3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IA(3 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) y el pico 3 correspondió al compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 514,0 (M+1) @ 1,09 min. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,91 (br. s., 1H), 6,66 (d,J= 8,53 Hz, 1H), 6,63 (s, 1H), 6,46 (d,J= 10,79 Hz, 1H), 6,12 (br. s., 1H), 5,47 (br. s., 1H), 5,16 (d,J= 3,51 Hz, 1H), 4,91 (br. s., 2H), 4,35 - 4,54 (m, 2H), 3,82 (td,J= 5,11, 10,60 Hz, 2H), 3,51 - 3,60 (m, 1H), 3,34 - 3,48 (m, 3H), 2,96 (t,J= 12,30 Hz, 1H), 2,35 - 2,47 (m, 1H), 1,91 - 2,06 (m, 3H), 1,84 (dq,J= 3,89, 12,76 Hz, 1H), 1,48 - 1,62 (m, 1H).



(3S,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IA (3 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min). El pico 2 de 3 correspondió al compuesto deseado. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 514,0 (M+1) @ 1,10 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d,J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 6,85 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,74 (d,J= 12,30 Hz, 1H), 6,47 - 6,66 (m, 4H), 4,23 (d,J= 12,80 Hz, 2H), 3,90 - 4,18 (m, 2H), 3,34 - 3,46 (m, 2H), 3,12 (br. s., 1H), 2,94 (br. s., 1H), 2,82 (t,J= 12,42 Hz, 1H), 2,10 (qd,J= 5,75, 12,11 Hz, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,56 - 1,72 (m, 1H), 1,37 - 1,52 (m, 1H).



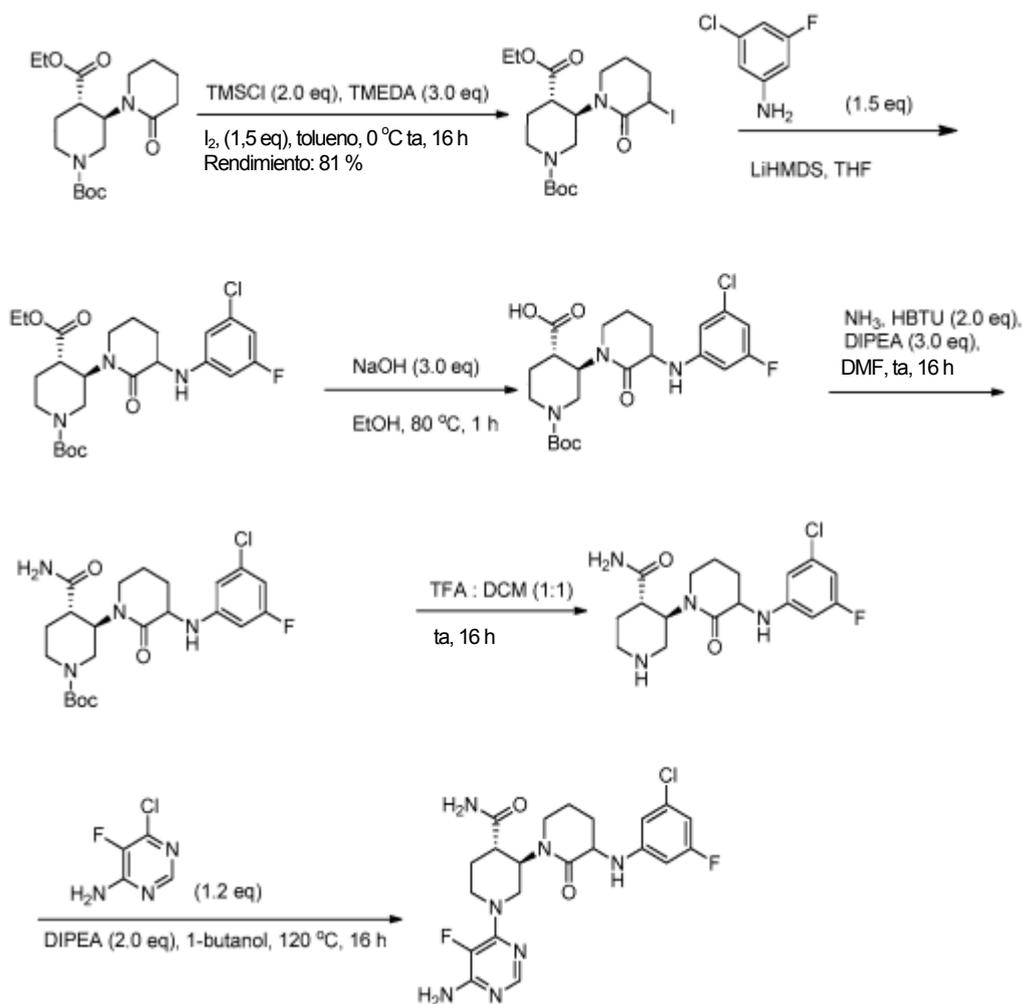
(3R,3'S,4R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IA (3 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min). El pico 1 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (IA (3 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 514,0 (M+1) @ 1,10 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, 1,5 Hz, 1H), 7,39 (s., 1H), 6,85 (s, 1H), 6,81 (s., 1H), 6,74 (d,J= 12,30 Hz, 1H), 6,47 - 6,66 (m, 4H), 4,16 - 4,46 (m, 2H), 3,95 - 4,16 (m, 2H), 3,34 - 3,48 (m, 2H), 3,12 (br. s., 1H), 2,87 - 3,01 (m, 2H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,10 (qd,J= 5,75, 12,11 Hz, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,54 - 1,74 (m, 1H), 1,35 - 1,52 (m, 1H).



(3S,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-fluoro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IA (3 x 15 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min). El pico 1 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (IA (3 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título.

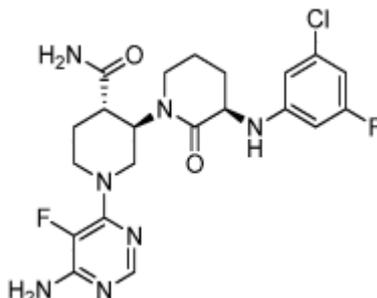
LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 514,0 (M+1) @ 1,10 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,38 (br. s., 1H), 6,84 (s, 2H), 6,70 (d, J= 12,30 Hz, 1H), 6,47 - 6,65 (m, 4H), 4,18 - 4,48 (m, 2H), 3,92 - 4,18 (m, 2H), 3,38 - 3,49 (m, 1H), 3,20 - 3,30 (m, 1H), 3,11 (br. s., 1H), 2,88 - 2,99 (m, 1H), 2,83 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,14 (qd, J= 6,03, 12,52 Hz, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,59 - 1,74 (m, 1H), 1,41 - 1,58 (m, 1H).

Ejemplo 9

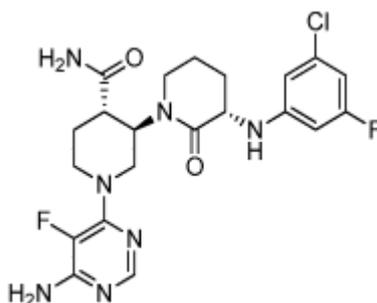


Síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-fluorofenil) amino)-2-oxo- [1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. Se usó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir el material crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con NH₃.H₂O al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (141 mg, Y: 30 %) como un sólido blanco. ESI-MS (M+H)⁺: 479,9. HPLC: (214 nm: 100 %, 254 nm: 100 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,78-7,77 (m, 1H), 7,40-7,38 (m, 1H), 6,86-6,82 (m, 1H), 6,62-6,55 (m,

3H), 6,45-6,37 (m, 3H), 4,26-3,94 (m, 4H), 3,47-3,39 (m, 1H), 3,20-3,03 (m, 2H), 2,90-2,78 (m, 2H), 2,18-2,04 (m, 1H), 1,86-1,34 (m, 5H).

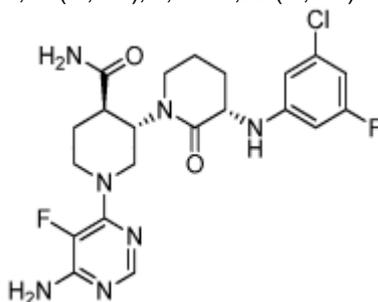


5 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-fluorofenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IC (2 x 15 cm), MeOH al 25 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título como el pico 3 respectivamente. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 480,0 (M+1) @ 1,01 min. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,90 (br. s., 1H), 6,44 (d, J = 8,53 Hz, 1H), 6,40 (s, 1H), 6,30 (br. s., 1H), 6,23 (d, J = 11,04 Hz, 1H), 5,63 (br. s., 1H), 5,09 (br. s., 1H), 4,94 (br. s., 2H), 4,45 (d, J = 12,80 Hz, 2H), 3,68 - 3,95 (m, 2H), 3,49 - 3,56 (m, 2H), 3,35 - 3,46 (m, 2H), 2,89 - 2,99 (m, 1H), 2,31 - 2,44 (m, 1H), 1,90 - 2,04 (m, 3H), 1,76 - 1,89 (m, 1H), 1,49 - 1,61 (m, 1H).

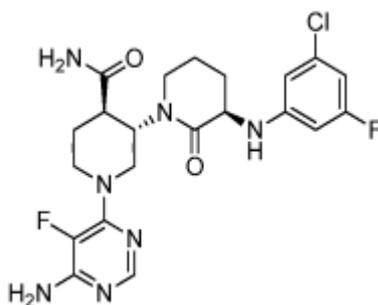


15 (3S,3'R,4S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-fluorofenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IC (2 x 15 cm), MeOH al 25 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título como el pico 1 respectivamente.

20 LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 480,0 (M+1) @ 1,01 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (s., 1H), 6,81 (s, 1H), 6,57 (s, 3H), 6,46 (d, J= 12,30 Hz, 1H), 6,39 (dd, J= 1,76, 8,78 Hz, 1H), 6,34 (d, J= 7,53 Hz, 1H), 4,28 (br. s., 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 1H), 4,13 (dd, J= 2,76, 12,30 Hz, 1H), 4,03 (td, J= 6,56, 10,98 Hz, 1H), 3,33 - 3,46 (m, 2H), 3,11 (br. s., 1H), 2,94 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,09 (qd, J= 5,75, 12,11 Hz, 1H), 1,72 - 1,92 (m, 3H), 1,56 - 1,72 (m, 1H), 1,29 - 1,50 (m, 1H).

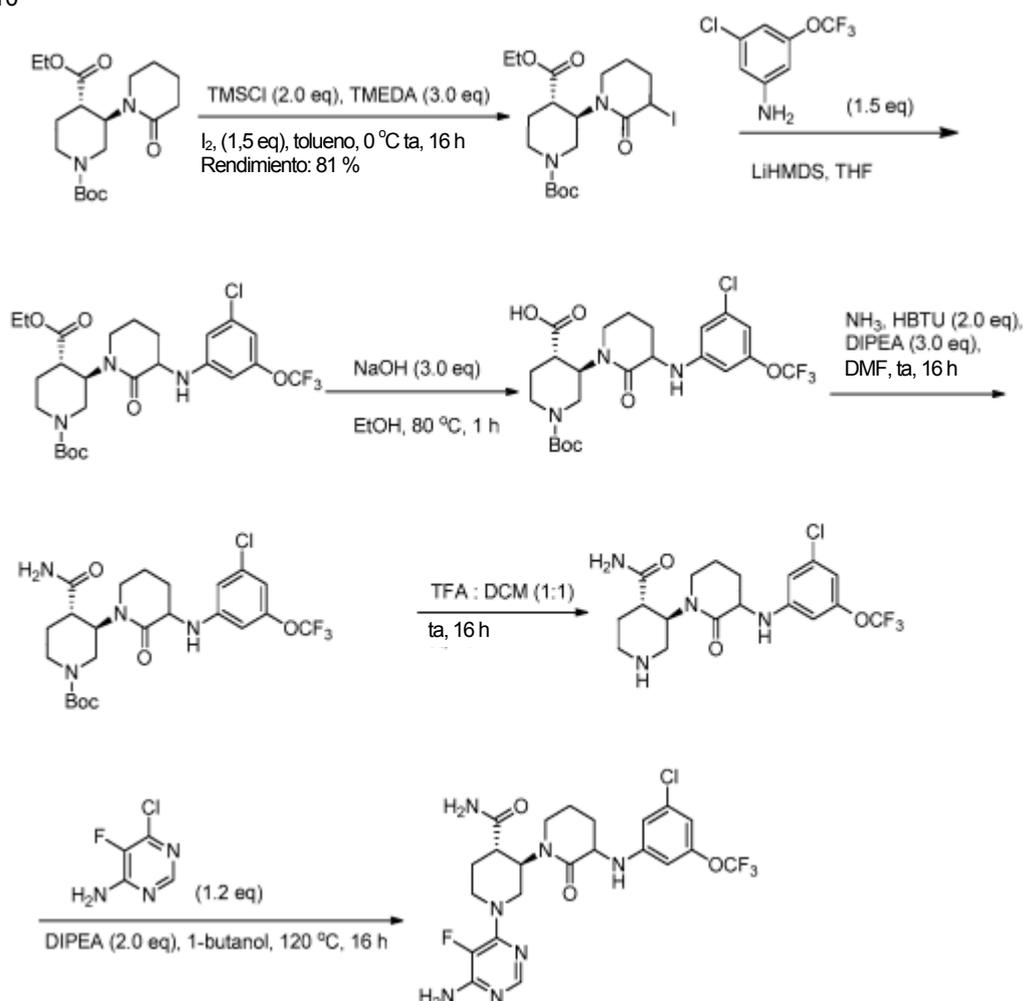


25 (3S,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-fluorofenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IC (2 x 15 cm), MeOH al 25 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 2 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (IA (3 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 480,0 (M+1) @ 1,01 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J= 2,01 Hz, 1H), 7,37 (br. s., 1H), 6,84 (s, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,55 (br. s., 1H), 6,30 - 6,48 (m, 3H), 4,28 (br. s., 1H), 4,23 (d, J= 13,05 Hz, 1H), 4,13 (dd, J= 3,39, 12,67 Hz, 1H), 3,97 (td, J= 6,84, 10,42 Hz, 1H), 3,38 - 3,50 (m, 1H), 3,22 - 3,29 (m, 1H), 3,10 (br. s., 1H), 2,71-2,97 (m, 1H), 2,83 (t, J= 12,30 Hz, 1H), 2,13 (qd, J= 6,13, 12,49 Hz, 1H), 1,73 - 1,91 (m, 3H), 1,58 - 1,73 (m, 1H), 1,39 - 1,53 (m, 1H).



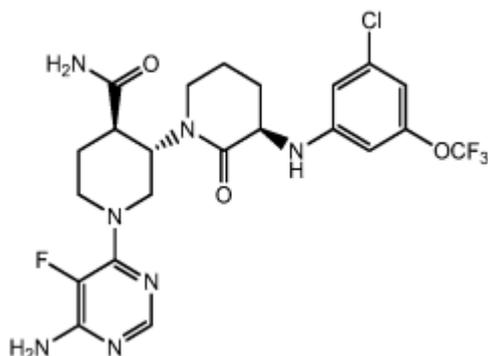
5 (3R,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-fluorofenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se separó en tres picos mediante SFC (IC (2 x 15 cm), MeOH al 25 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min). El pico 2 de 3 se purificó adicionalmente mediante SFC (IA (3 x 15 cm), iPrOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 60 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 480,0 (M+1) @ 1,01 min. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7,77 (d, J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (s, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,57 (s, 3H), 6,46 (td, J= 2,01, 12,30 Hz, 1H), 6,39 (td, J= 1,95, 8,66 Hz, 1H), 6,34 (d, J= 7,53 Hz, 1H), 4,18 - 4,48 (m, 2H), 4,09 - 4,18 (m, 1H), 3,79 - 4,09 (m, 1H), 3,33 - 3,45 (m, 2H), 3,11 (br. s., 1H), 2,92 (br. s., 1H), 2,82 (t, J= 12,42 Hz, 1H), 2,09 (qd, J= 5,75, 12,11 Hz, 1H), 1,74 - 1,93 (m, 3H), 1,51 - 1,74 (m, 1H), 1,32 - 1,51 (m, 1H).

Ejemplo 10



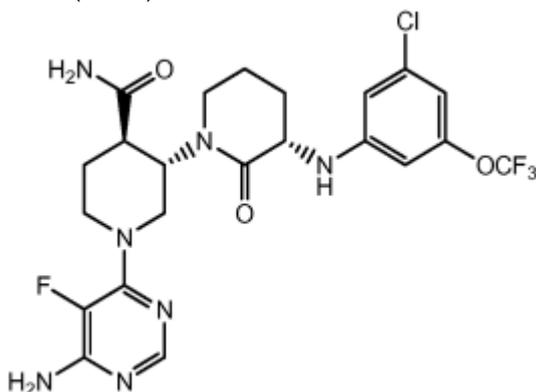
15 Síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometoxi)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. Se usó un procedimiento similar al descrito para la síntesis de (3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometil)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida 14 para producir el material crudo que se purificó mediante pre-HPLC (MeOH/H₂O con NH₃·H₂O al 0,05 % como fase móvil) para producir el compuesto del título (320 mg, rendimiento: 44 %) como un sólido amarillo. ESI-MS (M+H)⁺: 546,16. HPLC: (214 nm: 98,4 %, 254 nm: 98,0 %). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (s, 1H), 7,39 (s, 1H), 6,84-6,81 (m,

1H), 6,75-6,72 (m, 1H), 6,62-6,57 (m, 3H), 6,52-6,47 (m, 2H), 4,24-3,98 (m, 4H), 3,47-3,40 (m, 1H), 3,17-2,99 (m, 2H), 2,86-2,79 (m, 2H), 2,15-1,99 (m, 1H), 1,86-1,60 (m, 4H), 1,48-1,39 (m, 1H).



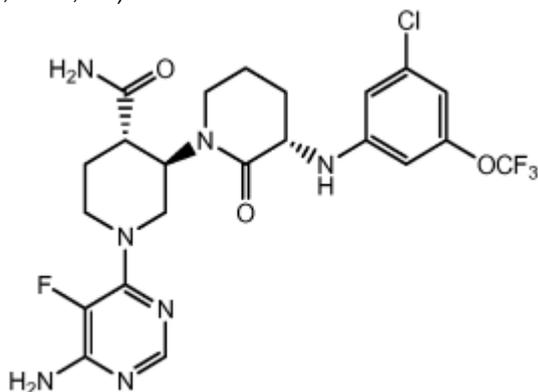
5 (3R,3'S,4R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometoxi)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se purificó mediante SFC (AD-H(2 x 25 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 546,0 (M+1) @ 1,20 min.¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d,J= 1,76 Hz, 1H), 7,39 (br. s., 1H), 6,81 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,38 - 6,52 (m, 2H), 4,23 (d,J= 13,05 Hz, 2H), 3,92 - 4,18 (m, 2H), 3,34 - 3,45 (m, 2H), 3,11 (br. s., 1H), 2,93 (br. s., 1H), 2,82 (t,J= 12,30 Hz, 1H), 2,08 (qd,J= 5,75, 12,11 Hz, 1H), 1,74 - 1,92 (m, 3H), 1,56 - 1,73 (m, 1H), 1,36 - 1,50 (m, 1H).

10



15 (3S,3'S,4'R)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometoxi)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se purificó mediante SFC (AD-H(2 x 25 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 546,0 (M+1) @ 1,23 min.¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d,J= 2,01 Hz, 1H), 7,37 (br. s., 1H), 6,84 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,43 - 6,54 (m, 2H), 4,23 (d,J= 13,05 Hz, 1H), 4,22 (br. s., 1H), 4,13 (dd,J= 3,26, 12,30 Hz, 1H), 4,01 (td,J= 6,81, 10,23 Hz, 1H), 3,44 (td,J= 6,18, 12,49 Hz, 1H), 3,20 - 3,29 (m, 1H), 3,11 (br. s., 1H), 2,88 (br. s., 1H), 2,83 (t,J= 12,30 Hz, 1H), 2,12 (qd,J= 6,05, 12,46 Hz, 1H), 1,73 - 1,91 (m, 3H), 1,59 - 1,73 (m, 1H), 1,48 (td,J= 9,41, 19,33 Hz, 1H).

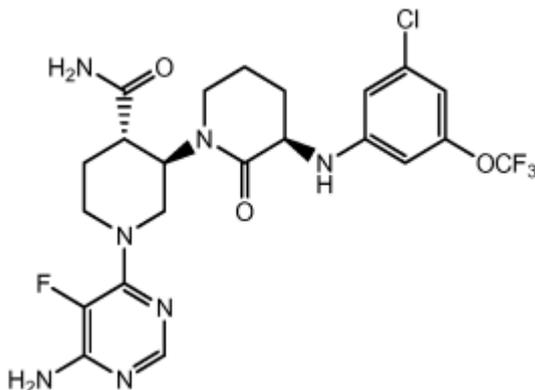
15



20 (3S,3'R,4S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometoxi)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se purificó mediante SFC (AD-H (2 x 25 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS m/e = 546,0 (M+1) @ 1,22 min.¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)δ: 7,77 (d, J = 2,01 Hz, 1H), 7,38 (br. s., 1H), 6,81 (s, 1H), 6,75 (s, 1H), 6,62 (s, 1H), 6,57 (s, 2H), 6,42 - 6,51 (m, 2H), 4,23 (d, J = 12,80 Hz, 2H), 3,97 - 4,18 (m, 2H), 3,34

25

- 3,44 (m, 2H), 3,10 (br. s., 1H), 2,93 (br. s., 1H), 2,82 (t, J = 12,17 Hz, 1H), 2,03 - 2,15 (m, 1H), 1,77 - 1,90 (m, 3H), 1,57 - 1,73 (m, 1H), 1,37 - 1,48 (m, 1H).

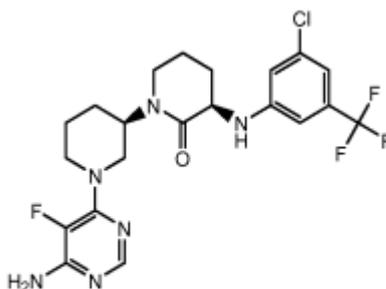


5 (3R,3'R,4'S)-1'-(6-amino-5-fluoropirimidin-4-il)-3-((3-cloro-5-(trifluorometoxi)fenil)amino)-2-oxo-[1,3'-bipiperidina]-4'-carboxamida. La mezcla de cuatro diastereómeros se purificó mediante SFC (AD-H (2 x 25 cm), EtOH al 30 % (DEA al 0,1 %)/CO₂, 100 bar, 70 ml/min) para producir el compuesto del título. LCMS (Agilent 460, 254 nm): ES (+) MS
 10 m/e = 546,0 (M+1) @ 1,23 min. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)δ: 7,93 (s, 1H), 6,60 (s, 1H), 6,52 (s, 1H), 6,35 (s, 1H), 5,85 (br. s., 1H), 5,32 (br. s., 1H), 4,97 - 5,15 (m, 1H), 4,78 (br. s., 2H), 4,46 (d, J= 13,05 Hz, 2H), 3,67 - 3,87 (m, 2H), 3,34 - 3,60 (m, 4H), 2,99 (t, J= 12,17 Hz, 1H), 2,34 - 2,49 (m, 1H), 1,91 - 2,08 (m, 3H), 1,83 (dq, J= 3,76, 12,72 Hz, 1H), 1,47 - 1,74 (m, 1H).

Ejemplo 11

15 Ensayo de la quinasa BTK in vitro: Ensayo BTK-POLYGAT-LS. El propósito del ensayo de la BTK in vitro fue determinar la potencia del compuesto contra BTK mediante la medición de la ₅₀. La inhibición del compuesto se midió después de monitorear la cantidad de fosforilación de un péptido polyGAT marcado con fluoresceína (Invitrogen PV3611) en presencia de la enzima BTK activa (Upstate 14-552), ATP y el inhibidor. La reacción de la quinasa BTK se realizó en una placa de 96 pocillos negra (costar 3694). Para un ensayo típico, a cada pocillo se
 20 añadió una alícuota de 24 ul de una mezcla maestra de ATP/péptido (concentración final; ATP 10 uM, polyGAT 100 nM) en tampón de quinasa (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, Na₃PO₄ 200 uM, DTT 5 mM, Triton X-100 al 0,01 % y caseína a 0,2 mg/ml). A continuación, se añadió 1 ul de una titración del compuesto 40X, 4 veces, en disolvente DMSO al 100 %, seguido de la adición de 15 ul de mezcla de la enzima BTK en tampón de quinasa 1X (con una concentración final de 0,25 nM). El ensayo se incubó durante 30 minutos antes de ser detenido con 28 ul
 25 de una solución de EDTA 50 mM. Las alícuotas (5 ul) de la reacción de quinasa se transfirieron a una placa blanca de 384 pocillos, de bajo volumen (Corning 3674) y se añadieron 5 ul de un tampón de detección 2X (Invitrogen PV3574, con anticuerpo Tb-PY20 4 nM, Invitrogen PV3552). La placa se cubrió e incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF) de Molecular Devices M5 (332 nm excitación; 488 nm emisión; 518 nm emisión de fluoresceína). Los valores de IC₅₀ se calcularon mediante el uso de un ajuste de cuatro parámetros con el 100 % de la actividad enzimática determinada del control con DMSO y el 0 %
 30 de actividad del control con EDTA.

Los compuestos seleccionados de fórmula I se analizaron y se encontraron activos en el ensayo de polyGAT. Los compuestos 1-1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 y 1-7 tuvieron valores de IC₅₀ de 0,73 nM, 0,68 nM, 2,07 nM, 0,63 nM, 1,6 nM y 1,2 nM respectivamente. El compuesto 1-6 tiene un valor de IC₅₀ menor que 1 nM. El compuesto comparador I<C>, mostrado más adelante, produjo un valor de IC₅₀ de 2,0 nM.



I^C

Ejemplo 12

Protocolo del estudio para determinar la activación del receptor nuclear p_{xr} en células dpx2 humanas

5 a) Resumen del protocolo: Se ha demostrado que PXR es un receptor nuclear primario que media la expresión de CYP3A4 inducida por fármacos (Bertilsson G, y otros; Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 13;95(21):12208-13). Basado en esta vía de inducción de CYP3A4, el ensayo del gen reportero de PXR basado en células se usa comúnmente para analizar nuevas entidades moleculares (NME) en una etapa temprana del descubrimiento de fármacos, para determinar su potencial para inducir CYP3A4 (Luo G, y otros; Drug Metab Dispos. 2002 Jul;30(7):795-804). Los estudios se diseñaron para evaluar el efecto de nuevas entidades moleculares (NME) sobre la activación del PXR humano en células DPX2. Las líneas celulares transfectadas establemente con el receptor nuclear PXR y los elementos de respuesta correspondientes se sembraron en placas de 96 pocillos. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se trataron con 6 concentraciones distintas de NME en pocillos por triplicado (véase más adelante), y las células se regresaron después a la incubadora por unas 24 horas adicionales. Al final de este periodo de incubación, se determinó la cantidad de células viables/pocillo mediante el uso del ensayo de citotoxicidad Cell Titer Fluor de Promega. Después de este ensayo, se añadió ONE-Glo de Promega a los mismos pocillos y se evaluó la actividad del gen reportero.

20 b) Sistema de prueba: El sistema de prueba consistió en la línea de células tumorales DPX2 transformadas establemente sembradas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Un vector de expresión que alberga el receptor nuclear PXR más los potenciadores y promotores adecuados unido al gen reportero de luciferasa se han integrado establemente en estas líneas celulares tumorales. La activación del receptor se evaluó mediante el monitoreo de la actividad del gen reportero, y mediante la comparación de los resultados con las células tratadas con vehículo. Los controles positivos consisten en células tratadas con 6 concentraciones diferentes (0,1, 0,5, 1, 5, 10 y 20 μ M) de rifampicina. De esta manera, los compuestos que activan PXR pueden identificarse fácil y rápidamente. Dado que se usaron líneas celulares integradas establemente, es posible observar una activación del receptor de 3 a 70 veces.

30 c) Procesamiento de datos y cinética de la activación del receptor: Los datos procesados mediante el uso de MS-Excel se calcularon como la media ($n = 3$) y % de CV de la activación de PXR en veces respecto de las células tratadas con vehículo para cada una de las 6 dosis diferentes. Todos los datos de activación se normalizaron respecto de la cantidad de células viables/pocillo. Los resultados también se expresaron como porcentaje de la respuesta dada por el control positivo adecuado a una dosis de 10 μ M. Los valores de EC₅₀ y E_{max} se derivaron para los compuestos de prueba que dan activación del receptor mediante el uso de regresión no lineal de las típicas curvas de dosis-respuesta log (Prism V5.0c, GraphPad Software, San Diego, CA). Los agentes que muestran curvas de dosis-respuesta atípicas no se analizaron de esta manera.

35 d) Nuevas entidades moleculares (NME): Los compuestos de prueba se analizaron a 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5 y 10 μ M

40 En el ensayo de PXR se analizaron compuestos seleccionados de fórmula I. Los compuestos 1-1, 1-2, 1-3, 1-4 y 1-5 produjeron un % de inducción de PXR (con relación a rifampicina 10 μ M) de 62 %, 42 %, 47 %, 67 % y 90 %, respectivamente. El compuesto comparador I^C, mostrado anteriormente, produjo un % de inducción de PXR de 95 %.

Ejemplo 13

45 Protocolo para el ensayo de inhibición de hERG FastPatch:

50 El canal de potasio cardiaco, hERG, es responsable de una rápida corriente de rectificación retrasada (I_{Kr}) en el ventrículo humano y la inhibición de I_{Kr} es la causa más común de prolongación del potencial de acción cardiaco por fármacos no cardiacos (véase, por ejemplo, Weirich y Antoni, Basic Res. Cardiol., 93, Suppl. 1, 125-32, 1998 ; Yap y Camm, Clin. Exp. Allergy, 29, Suppl. 3, 174-81, 1999). El aumento de la duración del potencial de acción se ha citado como un factor que provoca la prolongación del intervalo QT que se ha asociado con una arritmia ventricular peligrosa, torsade de pointes (Brown y Rampe, Pharmaceutical News, 7, 15-20, 2000).

55 Los efectos in vitro de los compuestos proporcionados se investigaron sobre la corriente del canal de potasio hERG (gen humano relacionado con el gen ether-à-go-go) (un sustituto para I_{Kr}, la corriente de potasio cardiaco, de rectificación retrasada y de activación rápida) expresado en células de riñón embrionario humano (HEK293) transfectadas establemente con ADNc de hERG. Las células se colocaron en solución salina fisiológica tamponada con HEPES en una placa de 96 pocillos revestida de vidrio y cargada con cantidades adecuadas de las soluciones de prueba y control para una duración de una exposición de 3 minutos en cada concentración. El compuesto de prueba se diluyó en DMSO al 0,3 %. Un sistema automatizado paralelo de la técnica de fijación de membranas (patch clamp), QPatch HT (Sophion Bioscience A/S, Dinamarca), se usó para evaluar a varias concentraciones (por ejemplo, 10 μ M). Los valores de IC₅₀ se estimaron basados en los datos de inhibición de hERG. El estudio se realizó en ChanTest (14656 Neo Parkway, Cleveland, OH). El análisis con QPatch se describen adicionalmente por Janzen y Bernasconi (eds.), High Throughput Screening, Methods and Protocols, Segunda Edición, vol. 565, capítulo 10, pg. 209-223, 2009.

En el ensayo de hERG se analizaron compuestos seleccionados de fórmula I. Los compuestos I-1, I-2, I-3 y I-4 tuvieron valores de IC₅₀ para hERG de 15,6 uM, 30 uM, 14,6 uM y 13,7 uM, respectivamente. El compuesto I-5 no muestra actividad observable en el ensayo de hERG a 10 uM (sin IC₅₀ disponible). El compuesto I-6 muestra poca actividad observable de hERG (< 20 % de inhibición) a 10 uM (sin IC₅₀ disponible). El compuesto I-7 muestra actividad de hERG (65 % de inhibición) a 10 uM (sin IC₅₀ disponible). El compuesto comparador I^C, mostrado anteriormente, produjo un valor de IC₅₀ para hERG de 1,18 uM o actividad (87 % de inhibición) a 10 uM.

Ejemplo 14

Atrapamiento de GSH en microsoma hepático humano: Protocolo

El compuesto de prueba (concentración final 10 uM) se incuba con microsomas hepáticos humanos o de rata (concentración final 1 mg/ml), junto con los cofactores activadores NADPH (concentración final 1 mM), fosfato de potasio (concentración final 100 mM pH 7,4), cloruro de magnesio (concentración final 3,3 mM) y el agente de atrapamiento GSH (concentración final 5 mM). La mezcla de incubación se incuba durante 60 min a 37 °C y se termina con acetonitrilo muy frío (igual volumen que la mezcla de incubación) y los sobrenadantes se aíslan. Los sobrenadantes se inyectan directamente para un análisis de LC/MS/MS o se secan en N₂ y se reconstituyen en mezcla de agua:acetonitrilo (80:20) antes del análisis de LC/MS/MS. El conjugado de GSH correspondiente se evalúa por medio de LC/MS/MS, mediante el uso de un Triple TOF5600/Xevo Qtof MSe.

Ejemplo 15

Modelo de artritis inducida por colágeno en ratas

El modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas Lewis hembras requiere respuestas inmunitarias de células T y B primarias a la inmunización con colágeno tipo II (CII) para el desarrollo de una enfermedad inflamatoria grave (véase Goldschmidt TJ, Holmdahl R. Cell Immunol. 154(1):240-8, 1994; Helfgott, S. M., y otros; Clin. Immunol. Immunopathol. 31:403, 1984; Holmdahl R. y otros, J Autoimmun. 7(6):739-52, 1994; y Stuart, J. M., y otros, J. Exp. Med. 155:1, 1982). La enfermedad clínica aparece después de un reto con CII secundario y la enfermedad progresa en los siguientes ocho días.

Generalmente, las ratas Lewis hembras se inmunizan con colágeno bovino tipo II en adyuvante incompleto de Freund. Las ratas (N=10/grupo) reciben diariamente la administración oral del compuesto de prueba o el vehículo BID mediante sonda oral que comienza en el día 1 (terapéutico). La gravedad clínica de la artritis se evalúa mediante mediciones con calibre de los tobillos que se llevaron a cabo cada día con inicio en el Día 0.

Protocolo detallado: Las ratas Lewis hembras se inmunizan por vía subcutánea con colágeno bovino tipo II (emulsión 1:1 de CII bovino a 2 mg/ml en ácido acético 0,01 N: Adyuvante incompleto de Freund) en tres sitios de la piel de la espalda. Seis días después de la inmunización las ratas reciben una segunda inyección subcutánea de CII bovino. Una suspensión del compuesto de fórmula I o vehículo (CMC al 0,5 %, Tween 80 al 0,1 %) se administran mediante sonda oral BID con inicio en el día 0 (profiláctico) (n=10 animales/grupo). La gravedad clínica de la CIA se evalúa mediante mediciones con calibre de los tobillos que se realizaron cada día con inicio en el día 9. Se toman mediciones iniciales con calibre del tobillo y se confirman como clínicamente normales (0,260-0,264 pulgada) para el tratamiento profiláctico. Las mediciones iniciales con calibre de los tobillos para los animales con enfermedad establecida se evalúan en el día 1 de la dosificación terapéutica y los animales se asignan aleatoriamente a los grupos de tratamiento después de la confirmación del inicio de la enfermedad clínica (0,2751-0,2755 pulgada). Los datos se analizan entre todos los grupos mediante el uso de un análisis de varianza de una vía (ANOVA de 1 vía), junto con una adecuada prueba posterior de comparaciones múltiples. La significancia para todas las pruebas se establece en $p \leq 0,05$.

Ejemplo 16

Análisis de la activación de la vía del BCR mediante la inhibición de la fosforilación de PLC γ 2

Protocolo: Un día antes del tratamiento, las células Ramos se siembran a una densidad de 3×10^5 células por pocillo en 200 μ l de medio completo en placas con filtro para cultivo de tejidos, de 96 pocillos (Millipore, Billerica, MA). En el día del tratamiento, el medio utilizado se elimina mediante filtración y las células se resuspenden en 200 μ l de medio libre de suero que contiene diluciones en serie del compuesto y DMSO a 0,1 %, después se incuban durante 2 horas a 37 °C. Las células se estimulan durante 5 minutos con anticuerpo de cabra anti- IgM humana a 10 μ g/ml a 37 °C. Todo el medio se elimina mediante filtración y las células se enjuagan con PBS frío después se lisan en hielo durante 1 hora con tampón de lisis que contiene; Tris 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 al 1 %, SDS al 0,1 %, coctel de inhibidores de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, (PMSF), mezcla de inhibidores de fosfatasa 2 (Sigma cat # P5726 de Sigma, St. Louis, Mo.) y mezcla de inhibidores de fosfatasa 3 (Sigma cat # P0044 de Sigma, St. Louis, Mo.). Los lisados se transfieren posteriormente a placas MSD estándar (Meso Escala Discovery, (MSD), (Gaithersburg, Maryland)), se tratan previamente con

anticuerpo de captura (anticuerpo anti-PLCy2 total B10, (Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA)) y se bloquean con BSA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se incuban en las placas MSD preparadas durante la noche a 4 °C con agitación suave. Los pocillos se lavan tres veces con TBST y se tratan con anti pPLCy2 (Santa Cruz) en BSA al 1 % en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan de nuevo tres veces con TBST y se tratan con anticuerpo anti- sulfo-etiqueta de conejo (MSD), durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con TBST, se añade el tampón de lectura de MSD y la luminiscencia se mide en un equipo MSD SECTOR Imager 6000. La respuesta máxima se determina como la luminiscencia promedio en los pocillos que contienen células estimuladas tratadas con anti-IgM y DMSO. La respuesta mínima se determina como la luminiscencia promedio en los pocillos que contienen células no estimuladas tratadas con DMSO solamente. Los valores máximo y mínimo se usan para normalizar la luminiscencia en los pocillos tratados con los compuestos. Los valores normalizados se grafican contra la concentración del compuesto en una escala logarítmica y después se analizan mediante el uso del programa informático Prism (GraphPad Software, Inc.). Una ecuación sigmoideal de dosis-respuesta con pendiente variable se usa para ajustar los datos y generar la concentración del 50 % de inhibición (IC₅₀).

Las células Ramos se incuban en placas de 96 pocillos con un intervalo de concentraciones de un compuesto de fórmula I durante 2 horas, se estimulan con anti-IgM a 10 µg/ml durante 5 minutos y se mide la fosforilación de PLCy2 mediante el uso de un inmunoensayo luminiscente electroquímico. El valor de EC₅₀ se calcula mediante el uso del programa informático GraphPad Prism.

Ejemplo 17

Inhibición de la proliferación de células B humanas inducida por BCR

Las células B CD19+ humanas se estimulan con un anticuerpo anti-IgM y la actividad de un compuesto de fórmula I se evalúa en términos de alterar el metabolismo celular después de 72 horas. En este contexto, el metabolismo celular se correlaciona directamente con la activación y proliferación celular, y puede reflejar además la supervivencia celular relativa durante la proliferación. El anticuerpo anti-IgM se evalúa en cuanto a sus efectos sobre la proliferación de células B y se determina que muestra la mitad de la concentración máxima para la activación de 10 µg/ml. Con el uso de estas condiciones de activación, se analizan concentraciones variables del compuesto de prueba, por triplicado en DMSO al 0,1 %, para determinar el impacto sobre el metabolismo celular de las células B CD19+ aisladas de diferentes donantes.

Protocolo: Las células B humanas se aíslan de las células mononucleares de sangre periférica o de las capas leucocitarias no purificadas mediante el uso de gradientes de Ficol-Hypaque (Amersham) y se seleccionan negativamente mediante la clasificación magnética de las células (kit de aislamiento de células B humanas II, Miltenyi Biotec). La pureza de las células objetivo se determina por citometría de flujo mediante tinción para marcadores de células B, células T y monocitos (CD19, CD3, CD14, respectivamente; BD Biosciences). Los datos se registran en un citómetro de flujo FACsCaliber y se analizan mediante el uso del programa informático FloJo (BD Biosciences). La pureza de las preparaciones de células B humanas normalmente es mayor que 95 %. Las células B humanas seleccionadas negativamente se estimulan con F(ab')₂ del anti-IgM a 10 µg/ml (Jackson ImmunoResearch) en placas de 96 pocillos. 100 000 células B en 0,2 ml de RPMI + FBS al 10 % se tratan con concentraciones variables (titradas a partir de 5000 nM a 0 nM en DMSO al 0,5 %) de un compuesto de fórmula I en pocillos por triplicado o control de vehículo en concentración final de DMSO al 0,5 % durante 30 minutos a 37 °C, CO₂ al 5 %, después las células se estimulan con F(ab')₂ del anti-IgM a 10 µg/ml. Las células B se estimulan durante 72 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. La proliferación se mide mediante el uso del reactivo CellTiter-Glo (Promega), según se midió en un luminómetro. Los valores medios se grafican contra la proliferación máxima y los valores de IC₅₀ se determinan mediante el uso del programa informático GraphPad Prism v5.

Ejemplo 18

Evaluación del efecto de los compuestos sobre la activación de células mieloides in vitro

Activación del FcγR de macrófagos primarios humanos. La activación mediada por autoanticuerpos y complejos inmunitarios a través del FcγR puede modelarse mediante la activación de macrófagos con IgG inmovilizada. Los macrófagos primarios humanos derivados de monocitos tratados con GM-CSF regulan positivamente los marcadores de activación como CD80, CD86, antígenos MHC y el receptor FcγRIII. Los macrófagos derivados de monocitos humanos pueden activarse por IgG humana purificada unida a la placa. Esta estimulación entrecruza el receptor FcγRIII e induce la secreción de citocinas proinflamatorias como TNFα, IL-6, IE1β y MCP-1. Los compuestos de fórmula I se evalúan para determinar la inhibición de la expresión de citocinas después de la activación del FcR de macrófagos humanos.

Generalmente, los macrófagos se cultivan en placas previamente incubadas con IgG purificada y después se lavan. Las titulaciones del compuesto de prueba (10 000 nM a 0 nM) se añaden a estos cultivos. Los sobrenadantes del cultivo celular se analizan mediante ELISA para determinar la expresión de TNFα e IL-6.

Protocolo: Los monocitos humanos se aíslan de las capas leucocitarias de donantes saludables y se seleccionan negativamente mediante clasificación magnética de las células (kit de aislamiento de monocitos II, Miltenyi Biotec). Los monocitos purificados se cultivan en medios estándar suplementados con FBS de baja IgG y GM-CSF a 100 ng/ml durante 5-7 días para inducir la diferenciación a macrófagos. Los macrófagos cultivados se estimulan con IgG purificada unida a la placa a 100 µg/ml ± una titración del compuesto de prueba (10 µM a 0 nM). Los sobrenadantes se recogen después de 4 hrs y 18 hrs y se analizan para determinar TNFα e IL-6, respectivamente.

Ejemplo 19

10 Eficacia en la artritis inducida por anticuerpos contra el colágeno en ratones

Este ejemplo no solo se refiere a la artritis, sino que además evalúa la actividad de autoanticuerpos y complejos inmunitarios in vivo y por lo tanto es relevante para otros trastornos inflamatorios como SLE. En este experimento, la actividad de los autoanticuerpos y los complejos inmunitarios produce un criterio de valoración patológico que depende de la señalización del FcR, y la porción Fc de tales anticuerpos se inhibe por la administración de un compuesto de fórmula I.

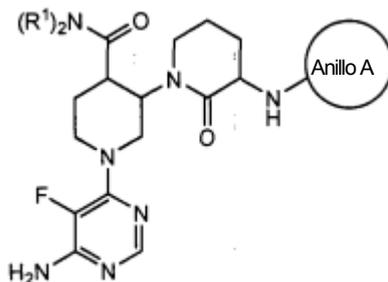
El modelo de artritis inducida por anticuerpos contra el colágeno (CAIA) en ratones DBA/1 hembras no requiere respuestas de células T y B cognadas para la inducción de inflamación sino más bien se basa en mecanismos efectores inmunitarios para el desarrollo de la enfermedad clínica. Un coctel de cuatro anticuerpos monoclonales específicos anti-colágeno II (CII) y el lipopolisacárido (LPS) estimulador inmunitario administrado 3 días después de la transferencia del anticuerpo específico del CII promueven la unión del anticuerpo-Receptor de Fc (Kagari T. y otros; J Immunol.170:4318-24 (2003)), la formación de complejos inmunitarios, la activación del complemento (Banda NK, y otros; Clin Exp Immunol. 159:100-8 (2010)) y la producción de citocinas proinflamatorias para inducir una enfermedad inflamatoria grave en un periodo de 10 días.

Generalmente, la artritis se induce mediante inyección de un coctel de anticuerpos monoclonales anti-colágeno en los ratones DBA/1 en el día 0. Los ratones (N=10/grupo) reciben diariamente la administración oral del compuesto de prueba QD o BID según se indica con inicio en el día 0. La inflamación de la pata se evalúa diariamente.

Protocolo: Los ratones DBA/1 hembras de 6 a 8 semanas de edad reciben 2 mg de un coctel de cuatro clones de anticuerpos monoclonales artritogénicos (Chondrex#10100) por vía i.v. en el día 0 seguido por una dosis de 50 ug de LPS 3 días más tarde. La suspensión del compuesto de prueba o el vehículo (CMC al 0,5 %, Tween 80 al 0,1 %) se administran BID mediante sonda oral con inicio en el día 0 (10 animales/grupo) justo antes de la transferencia i.v. del coctel de anticuerpos. La gravedad clínica de la CIA se evalúa mediante el monitoreo de la inflamación en las cuatro patas, con aplicación de una escala en el intervalo de 0 a 4. Cada pata se evalúa de la siguiente manera: 0, normal; 1, enrojecimiento leve pero definido e hinchazón del tobillo o la muñeca, o enrojecimiento e hinchazón de cualquier gravedad de 1 o 2 dígitos; 2, enrojecimiento de moderado a grave e hinchazón del tobillo o la muñeca, o más de dos dígitos; 3, enrojecimiento e hinchazón (edema pronunciado) de toda la pata; y 4, extremidad máximamente inflamada con participación de múltiples articulaciones. La suma de las cuatro puntuaciones individuales es el índice de artritis, con una puntuación máxima posible de 16 para cada animal.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



I

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

cada R¹ es independientemente hidrógeno, un grupo alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, un grupo heterocíclico monocíclico, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido, o un grupo heterociclilalquilo opcionalmente sustituido que tiene 3-7 átomos de carbono y 1-3 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre;

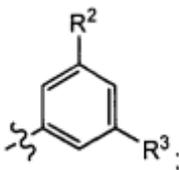
o dos grupos R¹ se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo heterocíclico monocíclico, saturado o parcialmente insaturado, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre;

en donde los grupos opcionalmente sustituidos pueden sustituirse con halógeno, -NO₂, -CN, -OR, -SR, -N(R)₂, -C(O)R, -CO₂R, -N(R)C(O)OR, -C(O)N(R)₂, -OC(O)R, -N(R)C(O)R, -S(O)R, -S(O)₂R, o -S(O)₂N(R)₂;

cada R es independientemente hidrógeno o un grupo alifático C₁₋₆;

o dos grupos R unidos al mismo nitrógeno se toman junto con sus átomos interventores para formar un anillo heterocíclico monocíclico, saturado o parcialmente insaturado, de 3-7 miembros, opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos, en donde cualquier segundo heteroátomo se selecciona independientemente de nitrógeno, oxígeno o azufre;

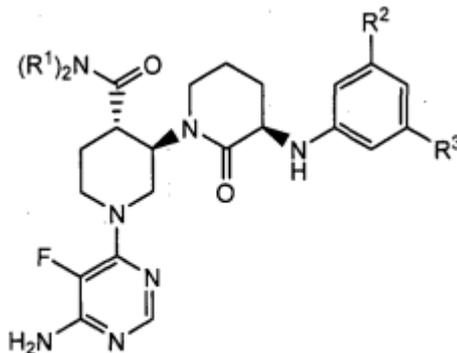
El anillo A es



R² es -Cl o -F; y

R³ es -CF₃, -OCF₃, o -F.

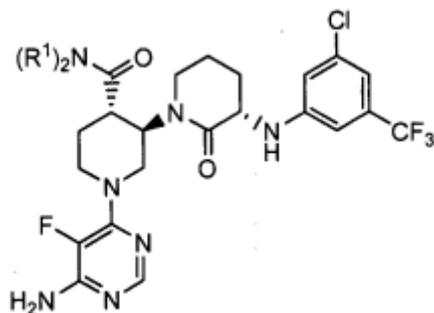
2. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de fórmula II-a:



II-a

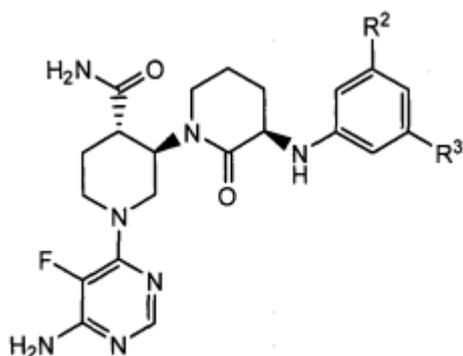
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o:

en donde el compuesto es de fórmula II-b:



II-b

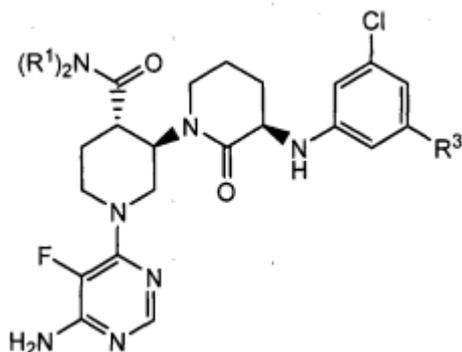
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o:
en donde el compuesto es de fórmula III:



III

5

3. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde el compuesto es de fórmula IV:



4. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, en donde R³ es -CF₃, o en donde R³ es -F.

10

5. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, en donde ambos R¹ son hidrógeno.

6. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, en donde un R¹ es hidrógeno y el otro R¹ es un grupo alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, preferentemente en donde un R¹ es hidrógeno y el otro R¹ es metilo.

15

7. El compuesto de conformidad con la reivindicación 3, en donde (i) ambos R¹ son grupos alifáticos C₁₋₆ opcionalmente sustituidos, o:

en donde (ii) un R¹ es hidrógeno y el otro es un grupo alifático C₁₋₆ opcionalmente sustituido, o:

en donde (iii) ambos R¹ son grupos alifáticos C₁₋₆ opcionalmente sustituidos, o:

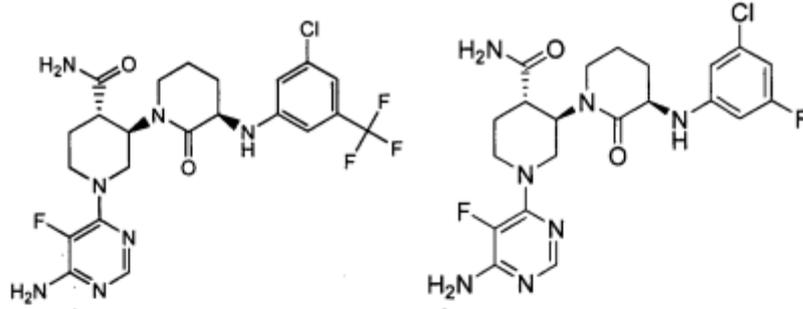
20

en donde (iv) ambos R¹ son hidrógeno.

8. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde R² es -Cl, o en donde R² es -F.

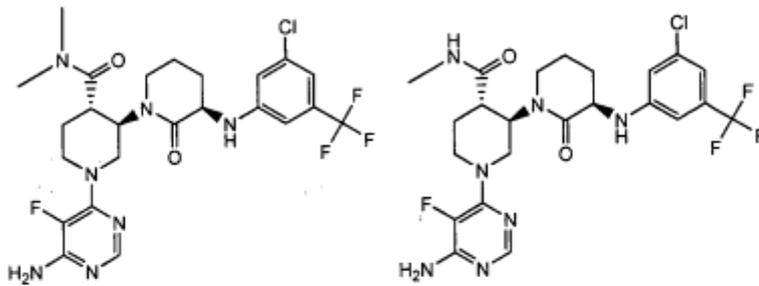
9. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, en donde R³ es -CF₃, o en donde R³ es -OCF₃, o en donde R³ es -F.

10. El compuesto de conformidad con la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:



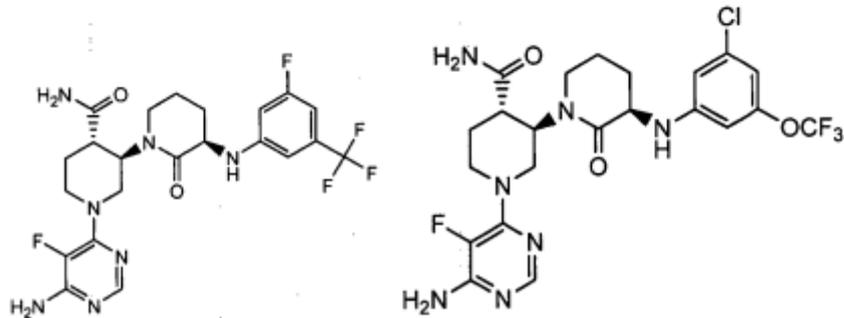
I-1

I-2



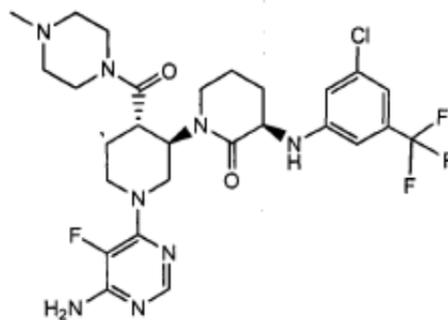
I-3

I-4



I-5

I-6



I-7

11. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición de este para usar en la disminución de la actividad enzimática de la tirosina quinasa de Bruton.
- 5 12. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición de este para usar en el tratamiento de un trastorno sensible a la inhibición de la tirosina quinasa de Bruton.
13. Un compuesto de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o una composición de este para usar en el tratamiento de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastornos autoinmunitarios, trastornos inflamatorios y cánceres.
- 10 14. El compuesto para usar de conformidad con la reivindicación 13, en donde el trastorno es artritis reumatoide, o en donde el trastorno es lupus eritematoso sistémico, o en donde el trastorno es dermatitis atópica, o en donde el trastorno es leucemia o linfoma.