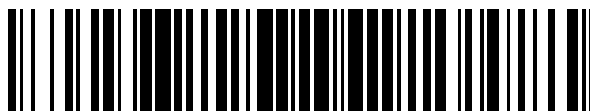


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 608**

51 Int. Cl.:

**C07D 487/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2015 PCT/US2015/032879**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15187451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2015 E 15745265 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3152212**

54 Título: **Derivados radiomarcados de un compuesto de 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-piridin-3-il]-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida útiles como inhibidores de ATR cinasa, la preparación de dicho compuesto y diferentes formas sólidas del mismo**

30 Prioridad:

**05.06.2014 US 201462008277 P**

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

**05.08.2020**

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
50 Northern Avenue, 15th Floor  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**AHMAD, NADIA;  
CHARRIER, JEAN-DAMIEN;  
DAVIS, CHRIS;  
ETXEARRIA I JARDI, GORKA;  
FRAYSSE, DAMIEN;  
KNEGTEL, RONALD;  
PANESAR, MANINDER;  
PIERARD, FRANCOISE;  
PINDER, JOANNE;  
STORCK, PIERRE-HENRI y  
STUDLEY, JOHN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 777 608 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

Derivados radiomarcados de un compuesto de 2-amino-6-fluoro-N-[5-fluoro-piridin-3-il]-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida útiles como inhibidores de ATR cinasa, la preparación de dicho compuesto y diferentes formas sólidas del mismo

### Antecedentes de la invención

La ATR cinasa ("relacionada con ATM y Rad3", por sus siglas en inglés) es una proteína cinasa implicada en las respuestas celulares al daño del ADN. La ATR cinasa actúa con la ATM cinasa ("ataxia telangiectasia mutada") y muchas otras proteínas para regular la respuesta de las células al daño del ADN, denominada comúnmente la respuesta al daño del ADN ("DDR", por sus siglas en inglés). La DDR estimula la reparación del ADN, promueve la supervivencia y detiene la progresión del ciclo celular activando los puntos de control del ciclo celular, lo que proporciona tiempo para la reparación. Sin la DDR, las células son mucho más sensibles al daño del ADN y mueren fácilmente por lesiones del ADN inducidas por procesos celulares endógenos, tales como la replicación del ADN o agentes exógenos que dañan el ADN usados comúnmente en el tratamiento contra el cáncer.

Las células sanas pueden contar con una gran variedad de proteínas diferentes para la reparación del ADN que incluyen la ATR cinasa de la DDR. En algunos casos, estas proteínas pueden compensarse entre sí activando procesos de reparación del ADN funcionalmente redundantes. Por el contrario, muchas células cancerosas albergan defectos en algunos de sus procesos de reparación del ADN, tales como la señalización de la ATM y por tanto, dependen en mayor medida de sus proteínas de reparación del ADN intactas, que incluyen ATR.

Además, muchas células cancerosas expresan oncogenes activados o carecen de supresores tumorales clave y esto puede hacer a estas células cancerosas propensas a fases desreguladas de replicación del ADN que a la vez producen daño al ADN. La ATR se ha implicado como un componente crítico de la DDR en respuesta a la alteración en la replicación del ADN. Como resultado, estas células cancerosas son más dependientes de la actividad de ATR para la supervivencia de las células sanas. Por consiguiente, los inhibidores de ATR pueden ser útiles para el tratamiento del cáncer, usados tanto solos como en combinación con agentes que dañan el ADN, ya que suprimen un mecanismo de reparación del ADN que es más importante para la supervivencia celular de muchas células cancerosas que para células normales sanas.

De hecho, se ha demostrado que la interrupción de la función de ATR (por ejemplo, mediante eliminación génica) promueve la muerte de células cancerosas tanto en ausencia como en presencia de agentes que dañan el ADN. Esto sugiere que los inhibidores de ATR pueden ser eficaces tanto como agentes únicos como potentes sensibilizadores a la radioterapia o la quimioterapia genotóxica.

Por todas estas razones, existe la necesidad de desarrollar inhibidores de ATR potentes y selectivos para el tratamiento de cáncer, ya sea como agentes individuales o como tratamientos combinados con radioterapia o quimioterapia genotóxica. Además, sería deseable tener una ruta sintética para los inhibidores de ATR que sea susceptible de síntesis a gran escala y mejore los métodos conocidos actualmente.

El péptido de ATR puede expresarse y aislarse usando una diversidad de métodos conocidos en la bibliografía (véase, por ejemplo, Ünsal-Kaçmaz et al, *PNAS* 99: 10, págs. 6673-6678, 14 de mayo de 2002; véase también Kumagai et al. *Cell* 124, págs. 943-955, 10 de marzo de 2006; Ünsal-Kaçmaz et al. *Molecular and Cellular Biology*, Feb 2004, págs. 1292-1300; y Hall-Jackson et al. *Oncogene* 1999, 18, 6707-6713). El documento WO2012/178124 se refiere a compuestos de pirrolopirazina útiles como inhibidores de ATR cinasa y a su uso en medicina.

### Breve descripción de las figuras

FIGURA 1a: XRPD de la base libre anhidra del Compuesto I-1  
 FIGURA 2a: TGA de la base libre anhidra del Compuesto I-1  
 FIGURA 3a: DSC de la base libre anhidra del Compuesto I-1  
 FIGURA 1b: XRPD de hidrato del Compuesto I-1  
 FIGURA 2b: TGA de hidrato del Compuesto I-1  
 FIGURA 3b: DSC de hidrato del Compuesto I-1  
 FIGURA 1c: XRPD de ácido tartárico del Compuesto I-1  
 FIGURA 2c: TGA de ácido tartárico del Compuesto I-1  
 FIGURA 3c: DSC de ácido tartárico del Compuesto I-1

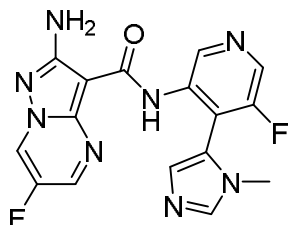
### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a formas sólidas de inhibidores de ATR, así como a inhibidores de ATR deuterados, como se define en las reivindicaciones 1 y 6, exponiéndose realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes. La presente invención también se refiere a procesos e intermedios para preparar un compuesto de aminopirazolopirimidina útil como un potente inhibidor de la ATR cinasa como se define en la reivindicación 5. Los

derivados de amino-pirazolopirimidina son útiles como inhibidores de ATR y también son útiles para preparar inhibidores de ATR.

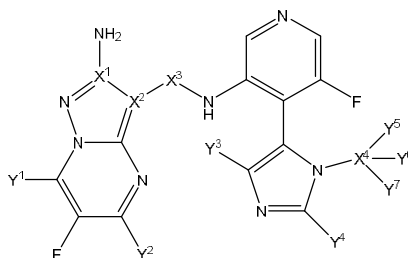
Un aspecto de la invención proporciona un proceso para preparar el compuesto **I-1**:

5



**I-1**

10 Otro aspecto de la presente invención comprende un compuesto de fórmula **I-A**:



**I-A**

15

o una de sus sales o derivados farmacéuticamente aceptables, en la que:

cada Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> es independientemente hidrógeno o deuterio; con la condición de que al menos uno de Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> es deuterio;

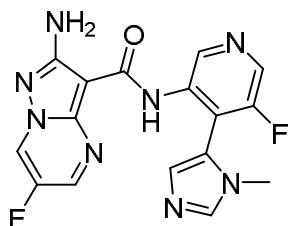
20

cada X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> se selecciona independientemente entre <sup>12</sup>C o <sup>13</sup>C; y

X<sup>3</sup> se selecciona independientemente entre -<sup>12</sup>C(O)- o -<sup>13</sup>C(O)-.

25

Otro aspecto más de la invención proporciona formas sólidas de un compuesto de fórmula **I-1**:



**I-1**

30

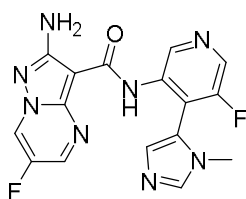
Otros aspectos de la invención se exponen en el presente documento.

### Descripción detallada de la invención

35

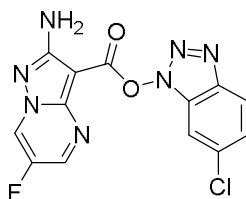
#### Procesos

Otro aspecto de la presente invención comprende un proceso para preparar un compuesto de fórmula **I-1**:



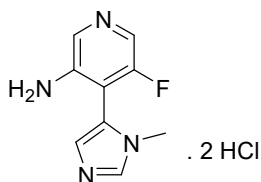
I-1

5 que comprende la etapa de hacer reaccionar el compuesto de fórmula **6b**:



6b

10 con un compuesto de fórmula **11**:

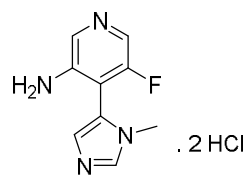


11

15 en condiciones adecuadas para formar un enlace de amida.

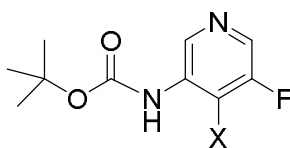
20 Las condiciones adecuadas para formar el enlace de amida comprenden hacer reaccionar el compuesto de fórmula **6b** con la 3-amino piridina sustituida **11** en presencia de un disolvente y una base orgánica. En una realización, el disolvente puede seleccionarse entre NMP, DMF o anisol (preferido). En otra realización, la base orgánica es una amina alifática seleccionada independientemente entre trietilamina o DIPEA (preferida).

25 Otras realizaciones más de la presente invención comprenden un proceso para preparar el compuesto de fórmula **11**:



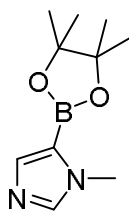
11

30 haciendo reaccionar el compuesto de fórmula **9**:



9

35 con un compuesto de fórmula **10**:



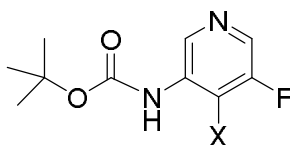
10

- 5 en condiciones de acoplamiento cruzado catalizado por metal adecuadas para formar un aducto que contiene un grupo amina protegido; y someter el aducto resultante a condiciones de desprotección adecuadas.

10 Las reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por metal adecuadas incluyen un catalizador de metal, un disolvente adecuado y una base adecuada. En algunas realizaciones, el catalizador de metal es un catalizador de paladio. Los ejemplos de catalizadores de paladio adecuados incluyen, pero sin limitación,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  y  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$  (en los que cada Ph es fenilo y dppf es 1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno). Las bases adecuadas incluyen, pero sin limitación, fosfato potásico,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{tBuOK}$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, DME, tetrahidrofurano, tolueno y etanol.

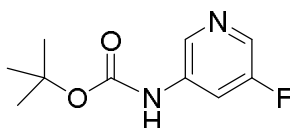
15 Las condiciones de desprotección adecuadas para retirar el grupo protector comprenden hacer reaccionar la especie protegida en presencia de un ácido fuerte, tal como HCl (preferido), HBr, ácido sulfúrico o ácido trifluoroacético.

20 Otra realización proporciona un proceso para preparar un compuesto de fórmula 9:



9

- 25 haciendo reaccionar el compuesto de fórmula 8:

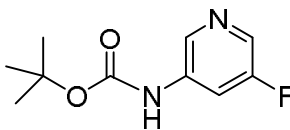


8

- 30 en condiciones de halogenación adecuadas.

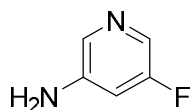
35 Las condiciones de halogenación adecuadas comprenden hacer reaccionar el compuesto 8 en un disolvente aprótico, en presencia de una base fuerte y una fuente electrófila de halógeno. En una realización, el disolvente puede seleccionarse entre DCM, éter dietílico o THF (preferido). En otra realización, la base fuerte se selecciona entre *tert*-BuLi, *sec*-BuLi o *n*-BuLi (preferido). En otra realización más, la especie electrófila para introducir el átomo de halógeno puede, por ejemplo, seleccionarse entre  $\text{I}_2$  (preferido),  $\text{CF}_3\text{I}$ , diyodoetano,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CBr}_4$ .

40 Otras realizaciones más de la presente invención proporcionan un proceso para preparar un compuesto de fórmula 8:



8

- 45 haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 7:



7

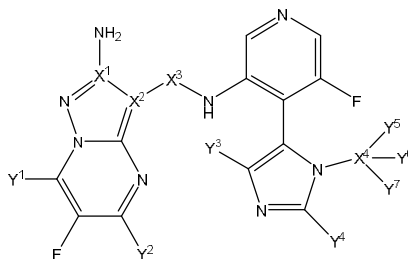
5 en condiciones adecuadas para generar un grupo amina protegido.

Las condiciones adecuadas para introducir el grupo protector comprenden hacer reaccionar la especie de amino **7** en un disolvente aprótico, en presencia de  $\text{Boc}_2\text{O}$ . Dicha reacción puede realizarse en presencia de una base. En una realización, el disolvente puede seleccionarse entre éter dietílico o THF (preferido). En otra realización, la base fuerte puede seleccionarse entre DMAP, *n*-BuLi, LHMDS o NaHMDS (preferido).

#### Compuestos deuterados

15 Pueden introducirse isótopos en el compuesto **I-1** seleccionando componentes básicos que contengan los átomos isotópicos (tanto comerciales o que pueden prepararse de acuerdo con las referencias) y metiéndolos en una secuencia similar al proceso nuevo y de la invención indicado para el material no marcado (descrito anteriormente).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula **I-A**:



I-A

o una de sus sales o derivados farmacéuticamente aceptables, en la que:

25 cada  $Y^1$ ,  $Y^2$ ,  $Y^3$ ,  $Y^4$ ,  $Y^5$ ,  $Y^6$  e  $Y^7$  es independientemente hidrógeno o deuterio; con la condición de que al menos uno de  $Y^1$ ,  $Y^2$ ,  $Y^3$ ,  $Y^4$ ,  $Y^5$ ,  $Y^6$  e  $Y^7$  es deuterio;

30 cada  $X^1$ ,  $X^2$  y  $X^4$  se selecciona independientemente entre  $^{12}\text{C}$  o  $^{13}\text{C}$ ; y

$X^3$  se selecciona independientemente entre  $^{-12}\text{C}(\text{O})-$  o  $^{-13}\text{C}(\text{O})-$ .

Los siguientes componentes básicos marcados, que pueden utilizarse en la ruta sintética para preparar el compuesto de Fórmula **I-A**, están todos disponibles en el mercado:

- 35
- Ácido 1,2-di $^{13}\text{C}$ -2-cianoacético;
  - Éster etílico del ácido 1- $^{13}\text{C}$ -2-ciano( $^{13}\text{C}$ )acético;
  - Éster etílico del ácido 2- $^{13}\text{C}$ -2-ciano( $^{13}\text{C}$ )acético;
  - 1-(trideuterometil)-1H-imidazol;
  - 40 ● 2,4,5-trideutero-1-(metil)-1H-imidazol; y
  - 2,4,5-trideutero-1-(trideuterometil)-1H-imidazol.

Otros componentes básicos marcados, que pueden utilizarse en la ruta sintética para preparar el compuesto de Fórmula **I-A**, son conocidos para los expertos en la materia. Estos pueden incluir, pero sin limitación, los siguientes componentes básicos marcados:

- 45
- ácido 2-ciano( $^{13}\text{C}$ )acético; Triplett et al., J Labelled Comp Radiopharm, 1978, 14(1), 35;
  - ácido 1- $^{13}\text{C}$ -2-cianoacético; Matsumoto et al., Heterocycles, 1985, 23(8), 2041;
  - ácido 2- $^{13}\text{C}$ -2-cianoacético; Baldwin et al., J Am Chem Soc, 1989, 111(9), 3319;
  - 50 ● 1-deutero-3-(dietilamino)-2-fluoroacraldehído; Funabiki et al., Chem Lett, 1997, (8), 739;
  - 2-deutero-1-(metil)-1H-imidazol; Torregrosa et al., Tetrahedron, 2005, 61(47), 11148-11155;
  - 4,5-dideutero-1-(metil)-1H-imidazol; Pavlik et al., J. Org. Chem., 1991, 56(22), 6313-6320;
  - 4,5-dideutero-1-(trideuterometil)-1H-imidazol; Mamer et al., Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005, 19(12), 1771-1774;

- 2-tritio-1-(metil)-1H-imidazol; Buncel et al., Can. J. Chem., 1986, 64(6), 1240-1245;
- 2,4,5-tritritio-1-(metil)-1H-imidazol; Grimmett, Scien of Synthesis, 2002, 325-528; y
- 1-(<sup>13</sup>C-metil)-1H-imidazol; Van Thuijl et al., Organic Mass Spectrometry, 1973, 7(10), 1165-1172.

5 En una o más realizaciones de la presente invención, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> se seleccionan independientemente entre deuterio o hidrógeno; e Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio.

En algunas realizaciones, Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> se seleccionan independientemente entre deuterio o hidrógeno; e Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio.

10 En otra realización, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> se seleccionan independientemente entre deuterio o hidrógeno; e Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son deuterio.

15 En otras realizaciones, Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> se seleccionan independientemente entre deuterio o hidrógeno; e Y<sup>2</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio.

En otras realizaciones más, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>4</sup> es <sup>13</sup>C.

En otra realización más, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>1</sup> y X<sup>4</sup> son <sup>13</sup>C.

20 En algunas realizaciones, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>3</sup> es -<sup>13</sup>C(O)-.

En otra realización, Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>2</sup> es deuterio; y X<sup>4</sup> es <sup>13</sup>C.

25 En otras realizaciones, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son hidrógeno; Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C.

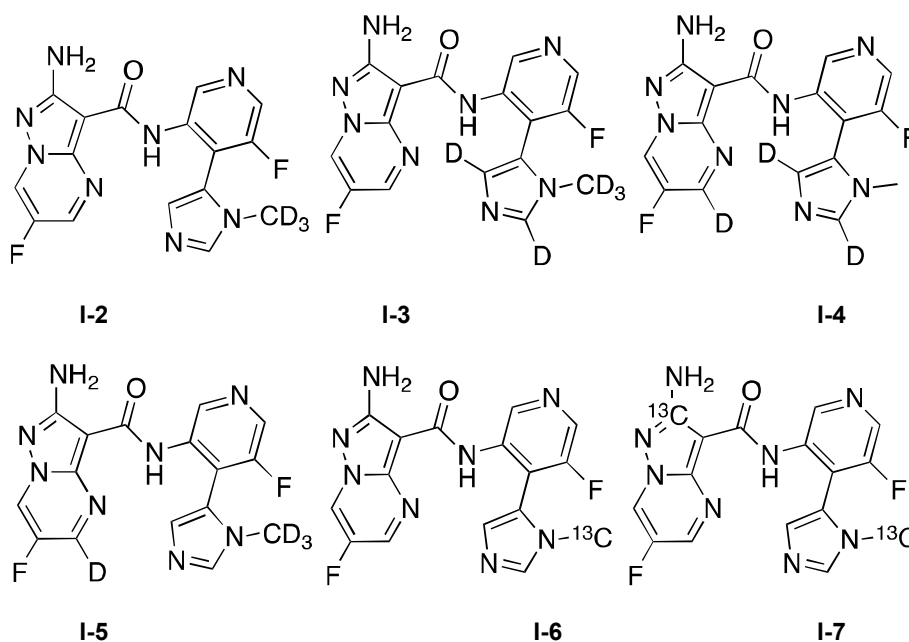
En otras realizaciones más, Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>2</sup> es deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C.

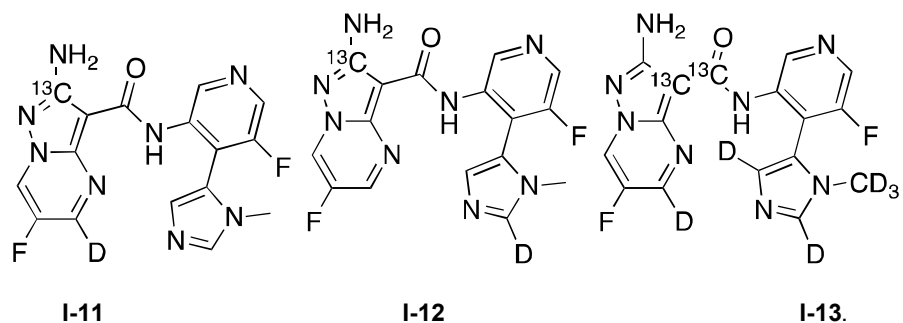
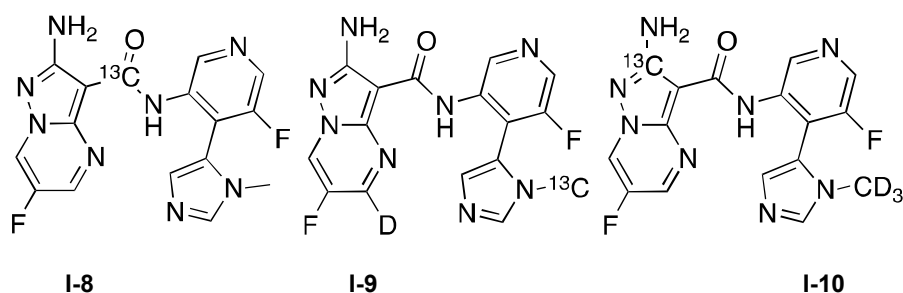
En otra realización más, Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>4</sup> es deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C.

30 En otra realización, Y<sup>1</sup> es hidrógeno; Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio; X<sup>2</sup> es <sup>13</sup>C; y X<sup>3</sup> es -<sup>13</sup>C(O)-.

35 En otro ejemplo, los compuestos de fórmula I-A de esta invención se representan en la Tabla 1. Se apreciará por los expertos en la materia que los compuestos de la presente invención pueden representarse en diversas formas tautoméricas.

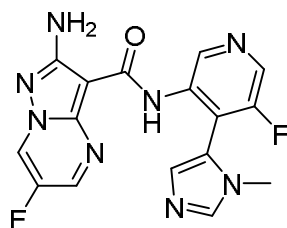
Tabla 1





#### Formas sólidas

Otro aspecto de la presente invención proporciona una forma sólida de un compuesto de fórmula **I-1**:



**I-1**

en la que, la forma se selecciona entre el grupo que consiste en la base libre anhidra del Compuesto **I-1**, hidrato del Compuesto **I-1** o ácido tartárico del Compuesto **I-1**.

#### Base libre anhidra del Compuesto **I-1**

En algunos aspectos de la presente invención, la forma sólida es la base libre anhidra del Compuesto **I-1**. En otro aspecto de la presente invención, la forma sólida es la base libre cristalina anhidra del Compuesto **I-1**. En algunas realizaciones, la forma sólida se caracteriza por uno o más picos expresados en 2-theta  $\pm$  0,2 a aproximadamente 9,9, 12,8, 15,4, 17,0, 23,1, 27,8, 29,0 y 30,1 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido usando radiación de CuKalfa. En otras realizaciones, la forma sólida se caracteriza por tener un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Figura 1a.

#### Hidrato del Compuesto **I-1**

En algunos aspectos de la presente divulgación, la forma sólida es un hidrato del Compuesto **I-1**. En otro aspecto de la presente divulgación, la forma sólida es hidrato cristalino del Compuesto **I-1**. En otras realizaciones, el hidrato cristalino del Compuesto **I-1** tiene una proporción de Compuesto **I-1** a agua de 1:3. En otras realizaciones más, El hidrato del Compuesto **I-1** se caracteriza por una pérdida de peso de aproximadamente un 12,6 % en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 40 °C y aproximadamente 100 °C. En algunas realizaciones, la forma sólida se caracteriza por uno o más picos expresados en 2-theta  $\pm$  0,2 a aproximadamente 27,5, 20,6 y 9,7 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido usando radiación de CuKalfa. En otras realizaciones más, la forma sólida se caracteriza por tener un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Figura 1b.

#### Ácido tartárico del Compuesto **I-1**





lineales o ramificados y cíclicos. Los ejemplos de tales tipos de grupos alifáticos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexenilo,  $-\text{CH}_2\text{-ciclopropilo}$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-ciclohexilo}$ .

El término "cicloalifático" (o "carbociclo" o "carbociclilo") se refiere a un hidrocarburo monocíclico  $\text{C}_3\text{-C}_8$  o hidrocarburo bicíclico  $\text{C}_8\text{-C}_{12}$  que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un único punto de unión al resto de la molécula, en el que cualquier anillo individual en dicho sistema de anillos bicíclico tiene 3-7 miembros. Los ejemplos de grupos cicloalifáticos incluyen, pero sin limitación, grupos cicloalquilo y cicloalquenilo. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin limitación, ciclohexilo, ciclopropilo y ciclobutilo.

El término "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico", como se usa en el presente documento, significa sistemas de anillo no aromáticos, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos, en los que uno o más miembros del anillo son un heteroátomo seleccionado independientemente. En algunas realizaciones, el grupo "heterociclo", "heterociclilo" o "heterocíclico" tiene de tres a catorce miembros en el anillo, en el que uno o más miembros del anillo son un heteroátomo seleccionado independientemente entre oxígeno, azufre, nitrógeno o fósforo, y cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros del anillo.

Los ejemplos de heterociclos incluyen, pero sin limitación, 3-1H-benzoimidazol-2-ona, 3-(1-alkil)-benzoimidazol-2-ona, 2-tetrahidrofuranilo, 3-tetrahidrofuranilo, 2-tetrahidrotiofenilo, 3-tetrahidrotiofenilo, 2-morfolino, 3-morfolino, 4-morfolino, 2-tiomorfolino, 3-tiomorfolino, 4-tiomorfolino, 1-pirrolidinilo, 2-pirrolidinilo, 3-pirrolidinilo, 1-tetrahidropiperazinilo, 2-tetrahidropiperazinilo, 3-tetrahidropiperazinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 1-pirazolinilo, 3-pirazolinilo, 4-pirazolinilo, 5-pirazolinilo, 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-piperidinilo, 2-tiazolidinilo, 3-tiazolidinilo, 4-tiazolidinilo, 1-imidazolidinilo, 2-imidazolidinilo, 4-imidazolidinilo, 5-imidazolidinilo, indolinilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, benzotiofano, benzoditiano y 1,3-dihidro-imidazol-2-ona.

Los grupos cíclicos, (por ejemplo, cicloalifáticos y heterociclos), pueden estar condensados linealmente, ser puenteados o espirocíclicos.

El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo o silicio (incluyendo, cualquier forma oxidada de nitrógeno, azufre, fósforo o silicio; la forma cuaternizada 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  $\text{NR}^+$  (como en pirrolidinilo N-sustituido)).

El término "insaturado", como se usa en el presente documento, significa que un resto tiene una o más unidades de insaturación. Como sabrá un experto en la materia, los grupos insaturados pueden estar parcialmente insaturados o completamente insaturados. Los ejemplos de grupos parcialmente insaturados incluyen, pero sin limitación, buteno, ciclohexeno y tetrahidropiridina. Los grupos totalmente insaturados pueden ser aromáticos, anti-aromáticos o no aromáticos. Los ejemplos de grupos totalmente insaturados incluyen, pero sin limitación, fenilo, ciclooctatetraeno, piridilo, tienilo y 1-metilpiridin-2(1H)-ona.

El término "alcoxi" o "tioalquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo, como se ha definido anteriormente, unido a través de un átomo de oxígeno ("alcoxi") o azufre ("tioalquilo").

Los términos "haloalquilo", "haloalquenilo", "haloalifático" y "haloalcoxi" significan alquilo, alquenilo o alcoxi, según sea el caso, sustituidos con uno o más átomos de halógeno. Este término incluye grupos alquilo perfluorados, tales como  $-\text{CF}_3$  y  $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ .

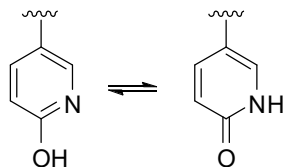
Los términos "halógeno", "halo" y "hal" significan F, Cl, Br o I.

El término "arilo" usado solo o como parte de un resto más largo como en "arilalquilo", "arilalcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillo monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en los que al menos un anillo del sistema es aromático y en los que cada anillo del sistema contiene de 3 a 7 miembros de anillo. El término "arilo" puede usarse de un modo intercambiable con la expresión "anillo arilo".

El término "heteroarilo", usado solo o como parte de un resto más largo como en "heteroarilalquilo" o "heteroarilalcoxi", se refiere a sistemas de anillo monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en el que al menos un anillo en el sistema es aromático, al menos un anillo en el sistema contiene uno o más heteroátomos y en el que cada anillo en el sistema contiene de 3 a 7 miembros de anillo. El término "heteroarilo" puede usarse de un modo intercambiable con la expresión "anillo heteroarilo" o el término "heteroaromático". Los ejemplos de anillos heteroarilo incluyen, pero sin limitación, 2-furanilo, 3-furanilo, N-imidazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, 5-imidazolilo, bencimidazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 5-oxazolilo, N-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, piridazinilo (por ejemplo, 3-piridazinilo), 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, tetrazolilo (por ejemplo, 5-tetrazolilo), triazolilo (por ejemplo, 2-triazolilo y 5-triazolilo), 2-tienilo, 3-tienilo, benzofurilo, benzotiofenilo, indolilo (por ejemplo, 2-indolilo), pirazolilo (por ejemplo, 2-pirazolilo), isotiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,2,5-oxadiazolilo, 1,2,4-oxadiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 1,2,5-tiadiazolilo, purinilo, pirazinilo, 1,3,5-triazinilo, quinolinilo (por ejemplo, 2-quinolinilo, 3-quinolinilo, 4-

quinolinilo) e isoquinolinilo (por ejemplo, 1-isoquinolinilo, 3-isoquinolinilo o 4-isoquinolinilo).

5 Debe entenderse que el término "heteroarilo" incluye ciertos tipos de anillos heteroarilo que existen en equilibrio entre dos formas diferentes. Más específicamente, por ejemplo, especies, tales como hidropiridina y piridinona (e igualmente hidroxipirimidina y pirimidinona) están destinadas a estar comprendidas dentro de la definición de "heteroarilo".



10 Las expresiones "grupo de protección" y "grupo protector" como se usan en el presente documento, son intercambiables y se refieren a un agente usado para bloquear temporalmente uno o más grupos funcionales deseados en un compuesto con múltiples sitios reactivos. En ciertas realizaciones, un grupo protector tiene una o más, o preferentemente todas, de las siguientes características: a) se añade selectivamente a un grupo funcional con buen rendimiento para dar un sustrato protegido que es b) estable a las reacciones que se producen en uno o más de los otros sitios reactivos; y c) puede retirarse selectivamente con buen rendimiento por reactivos que no atacan a los grupos funcionales desprotegidos regenerados. Como entendería un experto en la materia, en algunos casos, los reactivos no atacan otros grupos reactivos del compuesto. En otros casos, los reactivos también pueden reaccionar con otros grupos reactivos en el compuesto. Se detallan ejemplos de grupos protectores en Greene, T. W., Wuts, P. G en "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999 (y otras ediciones del libro). La expresión "grupo protector de nitrógeno", como se usa en el presente documento, se refiere a un agente usado para bloquear temporalmente uno o más sitios reactivos de nitrógeno deseados en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de nitrógeno preferidos también poseen las características ilustradas para un grupo protector anterior y ciertos grupos protectores de nitrógeno ejemplares también se detallan en el capítulo 7 en Greene, T. W., Wuts, P. G en "Protective Groups in Organic Synthesis", tercera edición, John Wiley & Sons, Nueva York: 1999.

25 En algunas realizaciones, una unidad de metileno de un alquilo o cadena alifática está opcionalmente reemplazada por otro átomo o grupo. Los ejemplos de tales átomos o grupos incluyen, pero sin limitación, nitrógeno, oxígeno, azufre, -C(O)-, -C(=N-CN)-, -C(=NR)-, -C(=NOR)-, -SO- y -SO<sub>2</sub>-. Estos átomos o grupos pueden combinarse para formar grupos más grandes. Los ejemplos de tales grupos más grandes incluyen, pero sin limitación, -OC(O)-, -C(O)CO-, -CO<sub>2</sub>-, -C(O)NR-, -C(=N-CN), -NRCO-, -NRC(O)O-, -SO<sub>2</sub>NR-, -NRSO<sub>2</sub>-, -NRC(O)NR-, -OC(O)NR- y -NRSO<sub>2</sub>NR-, en los que R es, por ejemplo, H o alifático C<sub>1-6</sub>. Debe entenderse que estos grupos pueden unirse a las unidades de metileno de la cadena alifática a través de enlaces sencillos, dobles o triples. Un ejemplo de un reemplazo opcional (átomo de nitrógeno en este caso) que está unido a la cadena alifática mediante un doble enlace sería -CH<sub>2</sub>CH=N-CH<sub>3</sub>. En algunos casos, especialmente en el extremo terminal, un reemplazo opcional puede unirse al grupo alifático mediante un triple enlace. Un ejemplo de esto sería CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡N. Debe entenderse que en esta situación, el nitrógeno terminal no está unido a otro átomo.

40 También debería entenderse que, la expresión "unidad de metileno" también puede referirse a unidades de metileno ramificadas o sustituidas. Por ejemplo, en un resto de isopropilo [-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], un átomo de nitrógeno (por ejemplo, NR) que reemplaza a la primera "unidad de metileno" recitada daría como resultado dimetilamina [-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. En casos tales como estos, un experto en la materia entendería que el átomo de nitrógeno no tendrá átomos adicionales unidos a él, y la "R" de "NR" estaría ausente en este caso.

45 A menos que se indique otra cosa, los reemplazos opcionales forman un compuesto químicamente estable. Los reemplazos opcionales pueden ocurrir dentro de la cadena y/o en cualquier extremo de la cadena; es decir, tanto en el punto de unión y/o también en el extremo terminal. Dos reemplazos opcionales también pueden ser adyacentes entre sí dentro de una cadena, siempre que produzca un compuesto químicamente estable. Por ejemplo, un alifático C<sub>3</sub> puede estar opcionalmente reemplazado por 2 átomos de nitrógeno to para formar -C-N≡N. Los reemplazos opcionales también pueden reemplazar completamente todos los átomos en una cadena. Por ejemplo, un alifático C<sub>3</sub> puede estar opcionalmente reemplazado por -NR-, -C(O)- y -NR- para formar -NRC(O)NR- (una urea).

55 A menos que se indique otra cosa, si el reemplazo ocurre en el extremo terminal, el átomo de reemplazo está unido a un átomo de hidrógeno en el extremo terminal. Por ejemplo, si una unidad de metileno de -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> estuviese reemplazada opcionalmente por -O-, el compuesto resultante podría ser -OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH. Debe entenderse que si el átomo terminal no contiene ningún electrón de valencia libre, entonces no se requiere un átomo de hidrógeno en el extremo terminal (por ejemplo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=O o -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C≡N).

60 La expresión "reacción de acoplamiento cruzado", como se usa en el presente documento, se refiere a una reacción en la que un enlace carbono-carbono se forma con la ayuda de un catalizador metálico. Normalmente, uno de los átomos de carbono está enlazado a un grupo funcional (un "grupo de acoplamiento cruzado") mientras que el otro

átomo de carbono está enlazado a un halógeno. Los ejemplos de reacciones de acoplamiento cruzado incluyen, pero sin limitación, acoplamientos de Suzuki, acoplamientos de Stille y acoplamientos de Negishi.

5 La expresión "grupo de acoplamiento cruzado", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo funcional capaz de reaccionar con otro grupo funcional (por ejemplo, halo) en una reacción de acoplamiento cruzado para formar un enlace carbono-carbono ("C-C"). En algunas realizaciones, el enlace C-C se forma entre dos grupos aromáticos.

10 La expresión "condición de acoplamiento cruzado", como se usa en el presente documento, se refiere a las condiciones químicas (por ejemplo, temperatura, duración de tiempo de reacción, volumen de disolvente requerido) que se necesitan para hacer posible que suceda la reacción de acoplamiento cruzado.

15 Los ejemplos de grupos de acoplamiento cruzado y sus condiciones de acoplamiento cruzado respectivas incluyen, pero sin limitación, ácidos borónicos y ésteres borónicos con condiciones de acoplamiento de Suzuki,  $\text{SnBu}_3$  (Bu: butilo) con condiciones de acoplamiento de Stille, y  $\text{ZnX}$  (X: halógeno) con condiciones de acoplamiento de Negishi.

20 Todas estas tres condiciones de acoplamiento implican típicamente el uso de un catalizador, un disolvente adecuado y, opcionalmente, una base. Las condiciones de acoplamiento de Suzuki implican el uso de un catalizador de paladio y un disolvente adecuado. Los ejemplos de catalizadores de paladio adecuados incluyen, pero sin limitación,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  y  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$  (en los que cada Ph es fenilo y dppf es 1,1-bis(difenilfosfino)ferroceno). Las bases adecuadas incluyen, pero sin limitación,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofurano, tolueno y etanol.

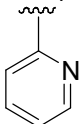
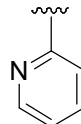
25 Las condiciones de acoplamiento de Stille implican el uso de un catalizador (normalmente paladio, pero algunas veces níquel), un disolvente adecuado y otros reactivos ópticos. Los ejemplos de catalizadores adecuados incluyen, pero sin limitación,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ ,  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  y  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$ . Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofurano, tolueno y dimetilformamida.

30 Las condiciones de acoplamiento de Negishi implican el uso de un catalizador (paladio o níquel) y un disolvente adecuado. Los ejemplos de catalizadores adecuados incluyen, pero sin limitación,  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ ,  $\text{Ni}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  y  $\text{Pd}(\text{Ph}_3)_4$  (donde "dba" es tris(dibencilidenoacetona)dipaladio). Los disolventes adecuados incluyen, pero sin limitación, tetrahidrofurano, tolueno y dimetilformamida.

35 Las condiciones de Suzuki, Stille y Negishi son conocidas para un experto en la materia y se describen con mayor detalle en una diversidad de referencias, incluyendo "March's Advanced Organic Chemistry".

40 Como entendería un experto en la materia, los grupos de acoplamiento cruzado se forman a partir de precursores de grupo de acoplamiento. Un precursor de grupo de acoplamiento es un reactivo o grupo reactivos utilizados para formar un grupo de acoplamiento cruzado. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, bis(pinacolato)diborano para la formación de ésteres de boronato, trimetilboratos para la formación de ácidos borónicos,  $\text{Bu}_3\text{SnCl}$  para la formación de estanoanos y  $\text{ZnCl}_2$  para la formación de cincatos en reacciones de acoplamiento de Negishi. Los ejemplos de condiciones de formación de grupo de acoplamiento adecuadas incluyen, pero sin limitación, preparar ésteres borónicos mediante catálisis mediada por paladio; preparar ácidos borónicos hidrolizando ésteres borónicos; preparar estanoanos por un proceso de dos etapas: 1) intercambio de metal halógeno, seguido de 2) transmetalación con  $\text{Bu}_3\text{SnCl}$  y preparar cincatos por un proceso de dos etapas: 1) intercambio de metal de halógeno, seguido de 2) adición de  $\text{ZnCl}_2$ .

50 A menos que se indique otra cosa, se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan también todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, geométricas, conformacionales y rotacionales) de las estructuras. Por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, los isómeros de doble enlace (Z) y (E) y los isómeros conformacionales (Z) y (E) están incluidos en esta invención. Como entendería un experto en la materia, un sustituyente puede rotar libremente alrededor de cualquier enlace giratorio. Por ejemplo,

un sustituyente representado como  también representa .

55 Por tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, geométricas, conformacionales y rotacionales de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención.

A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención.

60 En los compuestos de esta invención, cualquier átomo no designado específicamente como un isótopo particular está destinado a representar cualquier isótopo estable de ese átomo. A menos que se indique otra cosa, cuando una posición se designa específicamente como "H" o "hidrógeno", se entiende que la posición tiene hidrógeno en su

composición isotópica de abundancia natural. También a menos que se indique otra cosa, cuando una posición se designa específicamente como "D" o "deuterio", se entiende que la posición tiene deuterio en una abundancia que es al menos 3340 veces mayor que la abundancia natural de deuterio, que es 0,015 % (es decir, al menos una incorporación del 50,1 % de deuterio).

5 "D" y "d" se refieren ambos a deuterio.

10 Además, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento también pretenden incluir los compuestos que difieren únicamente en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras, excepto por la sustitución de hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C, están comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Dichos compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas o sondas analíticas en ensayos biológicos.

15 Como se usa en el presente documento, "cristalina" se refiere a un sólido que tiene una disposición y/o conformación específica de las moléculas en la red cristalina.

20 Como se usa en el presente documento, el término "amorfo" se refiere a formas sólidas que consisten en disposiciones desordenadas de moléculas y no poseen una red cristalina distinguible.

Como se usa en el presente documento, el término "solvato" se refiere a un aducto de sólido cristalino que contiene cantidades tanto estequiométricas como no estequiométricas de un disolvente incorporado dentro de la estructura cristalina. Si el disolvente incorporado es agua, dicho aducto se denomina "hidrato".

## 25 Abreviaturas

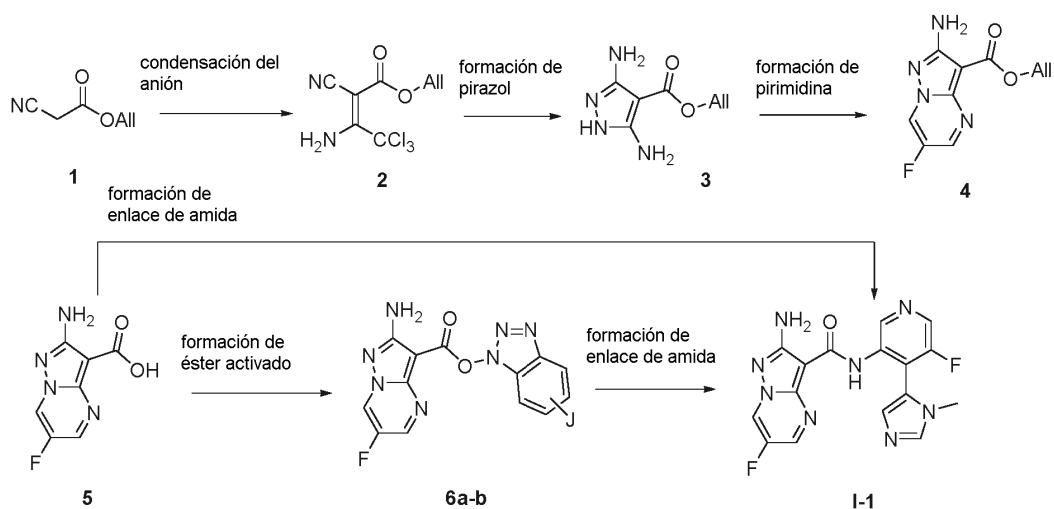
Se usan las siguientes abreviaturas:

DMSO	dimetilsulfóxido
DCM	diclorometano
ATP	trifosfato de adenosina
TFA	ácido trifluoroacético
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
CLEM	cromatografía líquida-espectrometría de masas
Tr	tiempo de retención
XRPD	Difracción de rayos X en polvo
DSC	Calorimetría de exploración diferencial
ATG	Análisis termogravimétrico
TA	temperatura ambiente
NMP	N-metil-2-pirrolidona
Pe	punto de ebullición
DMF	dimetilformamida
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
HOBT	hidroxibenzotriazol
HATU	hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio
TBTU	tetrafluoroborato 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
T3P	Anhídrido propilfosfónico
COMU	Hexafluorofosfato de 1-[(1-(ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenoamino)oxi)-dimetilamino-morfolino]]uronio
TCTU	tetrafluoroborato de [(6-clorobenzotriazol-1-il)oxi-(dimetilamino)metileno]-dimetil-amonio
HBTU	Hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametiluronio
DME	Dimetoxietano
THF	tetrahidrofurano
TMEDA	tetrametiletildiamina
NaHMDS	sodio hexametildisilazano
LHMDS	bis(trimetilsilil)amida de litio

## 30 Procesos

Los procesos y compuestos descritos en el presente documento son útiles para producir inhibidores de ATR que contienen un núcleo de aminopirazolopirimidina. Los procedimientos sintéticos generales mostrados en los esquemas en el presente documento son útiles para general una amplia gama de especies químicas que pueden utilizarse en la fabricación de compuestos farmacéuticos.

35

**ESQUEMA A**

5 Los compuestos de esta invención pueden sintetizarse de acuerdo con métodos similares al representado en el **Esquema A**.

Etapa 1

10 El anión del cianoacetato de alilo **1** disponible en el mercado puede reaccionar con, por ejemplo, tricloroacetnitrilo para proporcionar el intermedio **2**. En la etapa de condensación del anión, el anión del cianoacetato de alilo **1** disponible en el mercado puede generarse con una base, tal como acetato potásico, en un disolvente apropiado, tal como un alcohol (por ejemplo, isopropilalcohol). Después, el anión reacciona con tricloroacetnitrilo a temperatura ambiente.

15 Etapa 2

Después, el Intermedio **2** reacciona con hidrazina para formar el diaminopirazol **3**. En la etapa de formación de pirazol, el intermedio **2** se hace reaccionar con hidrazina (o su hidrato) en un disolvente aprótico, tal como DMF, para proporcionar el diaminopirazol **3**. La reacción sucede en condiciones básicas (por ejemplo, en presencia de acetato potásico o AcONa) con calentamiento (por ejemplo,  $\geq 110$  °C) para asegurar una ciclación completa.

20 Etapa 3

El Intermedio **3** puede condensarse adicionalmente con un compañero de acoplamiento dielectrófilo para formar la pirimidina **4**. En la etapa de formación de pirimidina, el intermedio **3** se hace reaccionar con una especie 1,3-dielectrófila (por ejemplo, un 1,3-dialdehído o un 3-(dialquilamino)-prop-2-enal) en diversos tipos de disolventes (por ejemplo, DMF o DMSO/agua) para formar los núcleos bicíclicos **4**. Cuando uno o dos de los centros electrófilos está protegido/enmascarado (por ejemplo, aldehído enmascarado como cetal), se requiere la introducción de un ácido sulfónico (por ejemplo, PTSA) para liberar el grupo funcional reactivo.

30 Etapa 4

La desprotección, por ejemplo, mediante hidrólisis, o del alil éster conduce a los ácidos carboxílicos **5**. En la etapa de desprotección, el compuesto **4** se somete a condiciones hidrolíticas que son conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento de **4** con fenilsilano o 4-metilbencenosulfonato en presencia de una cantidad catalítica de paladio (por ejemplo, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) conduce a la formación del ácido carboxílico **5** correspondiente. Como alternativa, los compuestos **4** podrían tratarse con un álcali acuoso (por ejemplo, NaOH, LiOH o KOH) para producir los ácidos **5**.

40 Etapa 5

En la etapa de formación de éster activado, los ácidos carboxílicos **5** se hacen reaccionar con agentes de acoplamiento de amida conocidos para los expertos en la materia. Los compañeros de acoplamiento de amida adecuados incluyen, pero sin limitación, TBTU, TCTU, HATU, T3P y COMU. Cuando el agente de acoplamiento se selecciona adecuadamente, las reacciones pueden tener lugar rápidamente (~1 h) a temperatura ambiente, en presencia de una base orgánica, tal como una amina alifática (por ejemplo, trietilamina, DIPEA) para proporcionar los ésteres activados **6a-b**. Por ejemplo, cuando se usan los agentes de acoplamiento de amida TBTU [J=H] o TCTU [J=Cl], los compuestos **6a-b** se obtienen fácilmente por filtración de la mezcla de reacción.

Se prefiere generalmente la formación de los ésteres activados **6a-b** antes de la formación del enlace de amida para preparar **I-A**, aunque también es posible la conversión directa de **5** en los compuestos de fórmula **I-A** de esta invención. También pueden utilizarse ésteres activados alternativos (aislados o formados *in situ*) y serán bien conocidos para los expertos en la materia (por ejemplo, usando agentes de acoplamiento TBTU, TCTU, HATU, T3P, COMU).

#### Etapa 6

En la etapa de formación de enlace de amida, los ésteres activados **6a-b** pueden reaccionar con la 3-aminopiridina sustituida **11** para proporcionar el compuesto **I-1** de esta invención. Las condiciones de reacción para el acoplamiento de amida son en un disolvente (por ejemplo, anisol, NMP, piridina, DMF, etc.) con calentamiento (por ejemplo,  $\geq 90$  °C).

Como alternativa, las dos etapas descritas anteriormente pueden combinarse: el ácido carboxílico **5** pueden usarse como punto de partida para la formación de enlace de amida, generándose los ésteres activados *in situ*, usando los mismos agentes de acoplamiento de amida que los descritos anteriormente. Los compuestos de esta invención se aíslan de una manera similar a la descrita anteriormente.

### PREPARACIONES Y EJEMPLOS

Todos los disolventes y reactivos disponibles en el mercado se usaron según se recibieron. Las reacciones de microondas se realizaron usando un microondas CEM Discovery. La cromatografía ultrarrápida, por ejemplo, se realizó en un sistema ISCO® Combiflash<sup>R</sup> Companion<sup>TM</sup> eluyendo con un gradiente del 0 al 100 % de EtOAc/éter de petróleo. También se utilizaron otros métodos conocidos en la técnica para realizar cromatografía ultrarrápida. Las muestras se aplicaron preabsorbidas sobre sílice. Donde se indique, se realizó cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) en una máquina Berger Minigram SFC. Todos los espectros de RMN <sup>1</sup>H se registraron usando un instrumento Bruker Avance III 500 a 500 MHz. Las muestras de EM se analizaron en un espectrómetro de masas Waters SQD con funcionamiento de ionización por electronebulización en modo iónico positivo y negativo. Las muestras se introdujeron en el espectrómetro de masas usando cromatografía. Todos los productos finales tuvieron una pureza  $\geq 95$  %, amenos que se especifique de otro modo en los detalles experimentales. La pureza de HPLC se midió en un sistema Waters Acquity UPLC con un instrumento Waters SQD MS, equipado con una columna Waters UPLC BEH C8 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm y una columna protectora Vanguard BEH C8 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 5 mm.

Como se usa en el presente documento, la expresión "Tr (min)" se refiere al tiempo de retención de HPLC, en minutos, asociado con el compuesto. A menos que se indique otra cosa, los métodos de HPLC utilizados para obtener los tiempos de retención indicados son como se describen a continuación:

#### Método de HPLC B

*Instrumento:* Waters Acquity UPLC-MS;

*Columna:* Waters UPLC BEH C8 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 50 mm con una columna protectora Vanguard BEH C8 1,7  $\mu$ m, 2,1 x 5 mm;

*Temperatura de la columna:* 45 °C;

*Fase móvil A:* formiato amónico 10 mM en 95:5 de agua:acetonitrilo, pH 9;

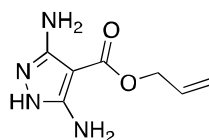
*Fase móvil B:* acetonitrilo;

*Detección:* 210-400 nm;

*Gradiente:* 0-0,40 min: 2 % de B, 0,40-4,85 min: de 2 % de B a 98 % de B, 4,85-4,90 min: de 98 % de B a 2 % de B, 4,90-5,00 min: parada a 2 % de B;

*Caudal:* 0,6 ml/minuto.

#### 50 Preparación 1: 3,5-Diamino-1H-pirazol-4-carboxilato de alilo



**3**

55

#### Etapa 1: 3-amino-4,4,4-tricloro-2-cianobut-2-enoato de alilo **2**

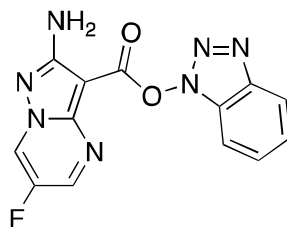
A una solución de KOAc (589,4 g, 6,006 mol) en isopropanol (3 l) se añadió cianoacetato de alilo (429,4 g, 403,2 ml, 3,432 mol) y la mezcla de reacción se enfrió a 5 °C. Se añadió en porciones de 50 ml tricloroacetonitrilo (495,5 g, 3,432 mol), manteniendo la temperatura por debajo de 15 °C. Después, la mezcla de reacción se dejó calentar a 20 °C y se agitó durante 3 h. Se añadió agua (~4 l) para disolver los materiales inorgánicos y el producto deseado se precipitó. La mezcla se agitó durante 20 minutos y el sólido se aisló por filtración al vacío. Este sólido se filtró, se lavó

con agua (2 x 0,5 l) y se secó en un horno de vacío durante una noche a 40 °C para proporcionar 3-amino-4,4,4-tricloro-2-cianobut-2-enoato de alilo **2** en forma de un polvo blanquecino (787 g, 85 %).

**Etapa 2: 3,5-Diamino-1H-pirazol-4-carboxilato de alilo 3**

5 A una suspensión de 3-amino-4,4,4-tricloro-2-ciano-but-2-enoato de alilo **2** (619 g, 2,297 mol) y KOAc (676,3 g, 6,891 mol) en DMF (2,476 l) a 0 °C se añadió lentamente hidrato de hidrazina (172,5 g, 167,6 ml, 3,446 mol) durante 15 min. Después, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, etapa en la que la RMN <sup>1</sup>H mostró el consumo completo del material de partida. Después, la mezcla de reacción se calentó durante una noche a 10  
10 110 °C antes de dejarse enfriar a temperatura ambiente y se agitó durante 48 h más. La mezcla se filtró a través de un embudo de vidrio sinterizado para retirar el sólido precipitado y el filtrado se evaporó a presión reducida para dar un líquido espeso. Se añadió DCM (aprox. 2 l) y la mezcla se filtró de nuevo para retirar los sólidos adicionales que habían precipitado. El filtrado se purificó a través de un lecho de 1 kg de gel de sílice (gradiente de DCM/MeOH como eluyente), y el disolvente se retiró para proporcionar un sólido de color naranja, que se suspendió en acetonitrilo y se  
15 calentó a aproximadamente 70 °C hasta que se disolvió todo el sólido, punto en el que la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente, después a 2 °C. El precipitado que se formó se aisló por filtración al vacío, se lavó con MeCN enfriado (~50 ml) y se secó a masa constante en un horno de vacío para formar el compuesto del título en forma de un polvo blanquecino (171,2 g, 41 %).

20 **Preparación 2a: 2-Amino-6-fluoropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ilo**



6a

25 **Etapa 1: 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de alilo 4**

A una suspensión de 3,5-diamino-1H-pirazol-4-carboxilato de alilo **3** (42,72 g, 234,5 mmol) en DMSO (270,8 ml)/agua (270,8 ml), se añadió hidrato de p-TsOH (46,72 g, 245,6 mmol) y 3-(diisopropilamino)-2-fluoro-prop-2-enal (descrito en  
30 *Tetrahedron Letters*, 33(3), 357-60; 1992) (38,69 g, 223,3 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 100 °C durante 3 h, tiempo durante el cual un sólido precipitó lentamente de la solución. La suspensión de color naranja se dejó enfriar a TA durante una noche. El sólido se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío para dar 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de alilo **4** en forma de un sólido terroso (45,05 g, rendimiento del 85 %).

35 **Etapa 2: ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico 5**

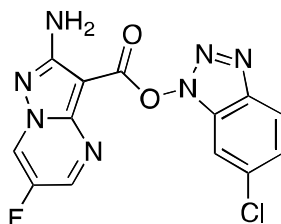
A una suspensión de 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de alilo **4** (45 g, 190,5 mmol) en DCM (1,35 l) se añadió fenilsilano (41,23 g, 46,96 ml, 381,0 mmol), seguido de Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (8,805 g, 7,620 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h 30 min. La mezcla de reacción se filtró y el sólido se lavó con DCM para  
40 dar un sólido de color amarillo claro (43,2 g). Este sólido se trituroó adicionalmente en DCM (225 ml) a TA durante 45 min, después se filtró y se secó durante una noche al vacío para proporcionar ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico **5** en forma de un sólido de color amarillo claro (37,77 g, rendimiento del 100 %).

En un método alternativo, se suspendió 4-metilbencenosulfonato (anhidro, 1,2 equiv., 22,6 g, 127 mmol) en DMSO seco (20 vol, 500 ml). La mezcla agitada se calentó a 30 °C en una atmósfera de nitrógeno. Una vez completa la disolución, se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (2 mol%, 2,4 g, 2,1 mmol). La mezcla se agitó durante 10 min a 25-30 °C, tiempo después del cual había presente una solución turbia de color amarillo. Se añadió en porciones 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de alilo **4** (25 g, 105,8 mmol), manteniendo la temperatura a 25-30 °C. Una vez se completó la adición, la solución turbia se agitó hasta que se completó la reacción según HPLC (2-3 h). Se formó un  
45 precipitado sólido después de 15 minutos tras la adición del sustrato. La mezcla se volvió más espesa a medida que tenía lugar la reacción. La mezcla de reacción se diluyó con agua (125 ml) y se añadió lentamente HCl 2 M (66 ml), manteniendo la temperatura a 25-30 °C. La suspensión se agitó durante 30 minutos, después se filtró. La filtración fue lenta (2 h). El sólido resultante se lavó con agua, después se secó sobre el sinterizado. El sólido se suspendió en DCM (8 vol) durante 1 h. El sólido se filtró (filtración rápida) y se lavó con DCM. El sólido se suspendió de nuevo en cloroformo (8 vol) durante 1 h. El ácido se filtró y se secó en el sinterizado. Esto se secó adicionalmente en un horno  
50 de vacío a 50 °C durante 24 h. El producto **5** se obtuvo en forma de un sólido de color blanquecino (18,6 g, 85 %); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,14 (1H, s a), 9,31 (1H, dd), 8,69 (1H, m), 6,47 (2H, s a); RMN <sup>19</sup>F (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ -153,65; EM (EN+) 197,1.



**Etapa 3: 2-amino-6-fluoropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de 1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-ilo 6a**

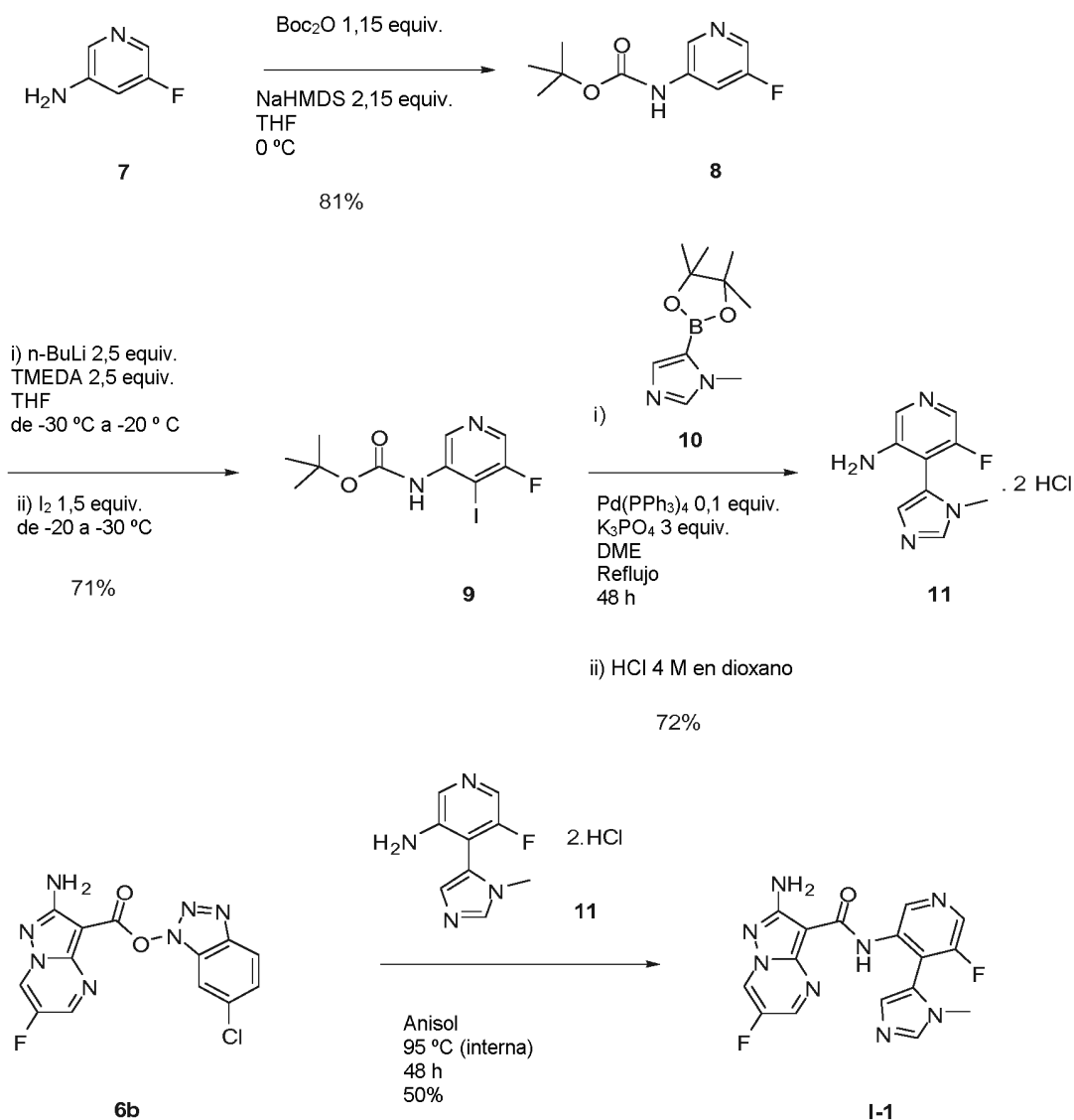
A una suspensión de ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico **5** (20 g, 102,0 mmol) en cloroformo (300 ml) se añadió Et<sub>3</sub>N (11,35 g, 15,63 ml, 112,2 mmol). La suspensión se agitó durante ~5 min y después se añadió boro tetrafluoruro de (benzotriazol-1-iloxi-dimetilamino-metileno)-dimetilamonio se añadió (32,75 g, 102,0 mmol). La suspensión se calentó a 60 °C durante 1 h antes de dejar enfriar la suspensión espesa a TA. La suspensión resultante se filtró, se lavó con cloroformo (200 ml) y se secó al vacío durante una noche para proporcionar el compuesto del título **6a** en forma de un polvo de color amarillo claro (32,5 g, 88 %).

**Preparación 2b: (6-clorobenzotriazol-1-il)-2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato 6b****6b**

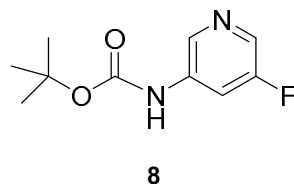
En un matraz de tres bocas y 2,5 l equipado con una barra de agitación, un condensador, una línea de nitrógeno y una sonda temperatura Hanna se cargó ácido 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico **5** (60 g, 305,9 mmol), cloroformo (900,0 ml) y trietilamina (32,44 g, 44,68 ml, 320,6 mmol). Se añadió en porciones [(6-clorobenzotriazol-1-il)oxi-(dimetilamino)metileno]-dimetil-amonio (lon tetrafluoruro de boro (1)) (87,00 g, 244,7 mmol) durante 5 min (la temperatura interna cayó de 22,7 a 21,5 °C al completarse la adición). La mezcla se calentó a 60 °C (temp. interna) durante 2 h, aun una suspensión de color crema. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, después el sólido se recogió por filtración, se lavó bien con cloroformo (hasta que el filtrado se volvió esencialmente incoloro) y se secó por succión para dejar el producto **6b** en forma de un sólido de color crema (82,2 g, rendimiento del 77 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,55 (dd, 1H), 8,91 (d, 1H), 8,22 (dd, 1H), 8,09 (dd, 1H), 7,57 (dd, 1H) y 6,87 (s, 2H). EM (EN+) 348,1.

En un método alternativo, se suspendió ácido 2-amino-6-fluoropirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxílico **5** (30 g, 153 mmol) en acetonitrilo (540 ml). Se añadió trietilamina (22,5 ml, 153 mmol), seguido de tetrafluoroborato de [(6-clorobenzotriazol-1il)oxi-(dimetilamino)metileno]-dimetilamonio (TCTU, 54,4 g, 153 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El producto se aisló por filtración, la torta de filtro se lavó con acetonitrilo (2 x 60 ml). El producto se obtuvo en forma de un sólido de color pardo (49,3 g, 93 %); RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 9,55 (dd, 1H), 8,91 (d, 1H), 8,22 (dd, 1H), 8,09 (dd, 1H), 7,57 (dd, 1H) y 6,87 (s, 2H); RMN <sup>19</sup>F (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -150,1; EM (EN+) 348,1.

**Ejemplo 1: Síntesis de 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida (Compuesto I-1)**



**Etapa 1: (5-fluoropiridin-3-il)carbamato de *tert*-butilo**



5

10

15

20

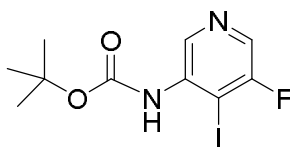
En un recipiente encamisado de 50 l se añadió THF (2,5 l), 5-fluoropiridin-3-amina 1 (500 g, 4,460 mol) y después más cantidad de THF (5 l). A esta mezcla agitada se añadió una solución de *tert*-butil carbonato de *tert*-butoxicarbonilo (1,119 kg, 5,129 mol) en THF (2,5 l), bombeada mediante una línea de vacío. Después, la línea se enjuagó con THF (1 l) en el recipiente de reacción. La temperatura de la reacción se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  antes de añadir NaHMDS (4,794 l de 2 M en THF, 9,589 mol) en porciones de 12 x 400 ml (exotermia de aprox.  $5^\circ\text{C}$  después de cada adición, administración continuada una vez la interna se enfrió a  $0^\circ\text{C}$ ). La adición se completó después de 1 h. La temperatura interna se elevó a  $5^\circ\text{C}$  y se agitó a esta temperatura durante 1 h. La reacción se interrumpió cuidadosamente mediante la adición lenta de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (1 l) (exotérmica). La interna se elevó a  $10^\circ\text{C}$  y se añadió más cantidad de solución acuosa saturada de cloruro de amonio (3 l). La interna se elevó a  $25^\circ\text{C}$  y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc (1 x 5 l después 1 x 2,5 l). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1 x 5,5 l después 1 x 3 l), después con salmuera (3 l).

La fase orgánica se concentró al vacío a un volumen total de aprox. 6 l, se secó (MgSO<sub>4</sub>), se filtró a través de un papel

de filtro y se concentró al vacío (en un rotavapor, temp. del baño 40 °C) hasta que cristalizó un producto (aprox. 2 l de disolvente restante). Se añadió heptano (2,5 l) y la mezcla se centrifugó en un rotavapor a 40 °C. La solución se concentró al vacío (en un rotavapor, temp. del baño 40 °C) para retirar más EtOAc hasta que el producto cristalizó desde la solución. Después, la mezcla se dejó enfriar y reposar a temperatura ambiente durante una noche. El sólido se recogió por filtración a través de un papel de filtro Whatman N.º 1, se lavó con heptano hasta que el filtrado se hizo esencialmente incoloro. El sólido se secó durante aprox. 5 h para dejar el cultivo 1 de producto en forma de un sólido de color blanquecino, 382,51 g.

Las aguas madre se concentraron lentamente al vacío (en un rotavapor, temp. del baño 40 °C) hasta que cristalizó un sólido. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una noche y el sólido se recogió por filtración, se lavó con heptano y se secó mediante succión para dejar el cultivo 2 de producto **8** en forma de un sólido de color blanquecino, 203,5 g. El proceso se repitió en las aguas madre para dar el cultivo 3 en forma de un sólido de color blanquecino, 178,7 g. Rendimiento total de producto, 764,71 g, 81 %. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 9,86 (s, 1H), 8,44 (s, 1H), 8,17 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 7,83 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 3,30 (s, 1H). EM (EN+) 213,0.

*Etapa 2: (5-fluoro-4-yodopiridin-3-il)carbamato de terc-butilo*



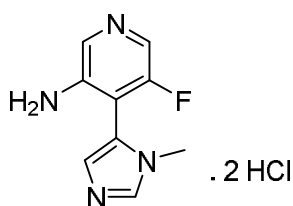
**9**

En un recipiente encamisado de 50 l se añadió THF (2,5 l), N-(5-fluoro-3-piridil)carbamato de *tert*-butilo **8** (400 g, 1,885 mol) en THF (2,5 l), más cantidad de THF (3 l) y N,N,N',N'-tetrametiletano-1,2-diamina (547,6 g, 711,2 ml, 4,712 mol). La mezcla de reacción se enfrió a -28 °C (temperatura interna), después se añadió n-BuLi (1,885 l de 2,5 M en hexanos, 4,712 mol) mediante una cánula a una velocidad tal para mantener la temperatura interna por debajo de -20 °C (es decir, durante 2 h). Tras la finalización de la adición, la mezcla de reacción se agitó a entre -30 y -20 °C (temperatura interna) durante 50 min más. Se añadió lentamente yodo molecular sólido (765,5 g, 3,016 mol) en 12 porciones prácticamente iguales durante 1 h. (se retrasó la exotermia aprox. 2/3 °C tras cada porción añadida) manteniendo la temperatura interna por debajo de -20 °C. Al completarse la adición de yodo, la mezcla de reacción se agitó a -30 °C (temperatura interna) durante 45 min más.

Después, la reacción se interrumpió mediante la adición lenta de una solución acuosa saturada de cloruro de amonio (2 l) (exotérmica). Después, se añadió agua (2 l) y la mezcla de reacción se calentó a 20 °C (temperatura interna) y se dejó en reposo durante una noche. A la mezcla de reacción se añadió EtOAc (5 l) y la agitación se continuó durante 10 min. La fase acuosa se retiró y después se añadió una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico (2 l) a la fase orgánica, se agitó vigorosamente durante 10 min. Se añadieron más cantidad de EtOAc (2,5 l) y agua (2 l) y la agitación se continuó durante 10 min. La fase acuosa se retiró y la fase orgánica se lavó adicionalmente con una solución acuosa saturada de tiosulfato sódico (2 l) y agua (1 x 2 l después 1 x 2,5 l) y después salmuera (2 l). La fase orgánica se concentró al vacío (rotavapor) hasta un volumen tal que el producto empezó a cristalizarse para dar una suspensión espesa. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una noche.

El sólido se recogió por filtración, se lavó con una cantidad mínima de EtOAc (unos pocos cientos ml), después se lavó bien con heptano, se secó mediante succión durante 3 h para dejar un cultivo 1 de producto **9** en forma de un sólido de color blanco, 311,99 g. Las aguas madre se concentraron a sequedad al vacío (rotavapor) dejando un sólido de color verde oscuro, (aprox. 200 g) que se disolvió en EtOAc (750 ml) mediante calentamiento a reflujo. Después se añadió carbono activado (20 g) y la mezcla se agitó a la temperatura de reflujo durante 10 min. La mezcla se filtró a través de papel de filtro, después se concentró lentamente sobre el rotavapor hasta que se formó una suspensión espesa. El sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con una cantidad mínima de EtOAc, después heptano, se secó mediante succión en un horno de vacío a 40 °C durante 2 h, dejando el cultivo 2 en forma de un sólido de color blanco, 103,9 g. Las aguas madre se concentraron de nuevo hasta que se formó una suspensión espesa. El sólido se recogió por filtración, se lavó con heptano y se secó mediante succión al vacío (rotavapor), después en un horno de vacío a 40 °C durante unas pocas horas para dejar un cultivo de producto 3 en forma de un sólido de color blanco, 39,4 g. Rendimiento total = 455,29 g, 71 %. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,98 (s, 1H), 8,27 (dd, J = 1,2, 0,6 Hz, 2H), 1,47 (s, 9H). EM (EN+) 338,9.

*Etapa 3: diclorhidrato de 5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-amina*

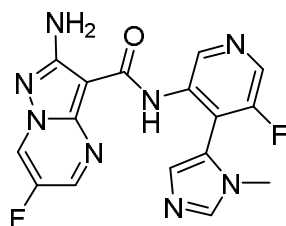


11

5 A una mezcla desgasificada (3 x ciclos de vacío/nitrógeno) de N-(5-fluoro-4-yodo-3-piridil)carbamato de *terc*-butilo **9** (190 g, 561,9 mmol), 1-metil-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)imidazol **10** (175,4 g, 842,8 mmol) y fosfato potásico (226,0 g, 1,686 mol) en DME (2,28 l) se añadió Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (64,93 g, 56,19 mmol). El recipiente de reacción se enjuagó de nuevo con nitrógeno mediante ciclos de vacío/nitrógeno (3 x). La mezcla se calentó a reflujo y en una atmósfera de nitrógeno durante 48 h. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, después se pasó a través de un lecho de celite, enjuagando a su través con EtOAc hasta que el filtrado fue casi incoloro (aprox. 1,5 l). El filtrado se concentró al vacío para dejar un sólido pegajoso de color pardo, 339,7 g.

15 El producto en bruto se disolvió en dioxano (950 ml) y metanol (431,1 ml) y la solución se enfrió en un baño de hielo (interna de 10 °C), después se añadió HCl (4 M en 1,4-dioxano) (842,8 ml de 4 M, 3,371 mol) en 8 porciones prácticamente iguales durante 20 min. (aproximadamente de 3 a 4 °C de exotermia observada en cada adición). Tras la finalización de la adición, la mezcla se calentó a 40 °C y se agitó a esta temperatura durante 3 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una noche con agitación. El sólido se recogió por filtración, se lavó con 1,4-dioxano y se secó al vacío durante 1 h para dejar el producto **11** en forma de un sólido de color tierra/pardo (107,9 g, rendimiento del 72 %). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, óxido de deuterio) δ 9,09 (s, 1H), 8,24 (s, 1H), 8,15 (s a, 1H), 7,91 – 7,90 (1H, s a), 7,88 (m, 1H), 3,85 (s, 3H). EM (EN+) 193,1.

**Etapa 4: 2-amino-6-fluoro-N-(5-fluoro-4-(1-metil-1H-imidazol-5-il)piridin-3-il)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxamida (Compuesto I-1)**



25 Una mezcla de diclorhidrato de 5-fluoro-4-(3-metilimidazol-4-il)piridin-3-amina **11** (8,006 g, 30,2 mmol) y 2-amino-6-fluoro-pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-carboxilato de (6-clorobenzotriazol-1-ilo) **6b** (10 g, 28,76 mmol) se suspendió en anisol (100 ml). A esta suspensión se añadió DIPEA (8,177 g, 11,02 ml, 63,27 mmol) y la mezcla se calentó a 95 °C (temperatura interna) durante 44 h, después se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una noche. El sólido se recogió por filtración, se lavó con una cantidad mínima de anisol (aprox 20 ml), se secó al vacío durante 1 h, después el sólido se secó en un horno de vacío a 45 °C (temperatura interna) durante 2 h para dejar un producto en forma de un sólido de color amarillo claro, 7,8 g. Este sólido se suspendió en agua (78 ml) y MeCN (117 ml) y se añadió TFA (2,4 g, 1,62 ml, 1 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min, después se filtró a través de papel de filtro, se lavó a su través con una pequeña cantidad de agua. El filtrado se basificó a pH = 8 mediante la adición de carbonato sódico 2 M mientras se agitaba. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua, después se secó al vacío durante 1 h. Después, el sólido se secó en un horno de vacío a 45 °C (temperatura interna) durante una noche dejando el producto **I-1** en forma de un sólido de color amarillo pálido, 5,29 g. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 9,68 (s, 2H), 9,42 (dd, *J* = 4,8, 2,5 Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,31 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,25 (d, *J* = 1,0 Hz, 1H), 6,71 (s, 2H), 3,46 (s, 3H). EM (EN+) 371,0.

#### Datos analíticos del compuesto

Comp. n.º	CLEM EN +	CLEM (Tr min)	RMN H
I-1	371,0	1,80	RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> 6) δ 9,68 (s, 2H), 09,42 (dd, <i>J</i> = 4,8, 2,5 Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 8,31 (d, <i>J</i> = 2,5 Hz, 1H), 8,07 (s, 1H), 7,25 (d, <i>J</i> = 1,0 Hz, 1H), 6,71(s, 2H), 3,46 (s, 3H).

#### 45 Formas sólidas del Compuesto I-1

El Compuesto **I-1** se ha preparado de diversas formas sólidas, incluyendo formas anhidras. Las formas sólidas de la

presente invención son útiles en la fabricación de medicamentos para el tratamiento del cáncer. Una realización proporciona el uso de una forma sólida descrita en el presente documento para tratar el cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama triple negativo, cáncer de páncreas, cáncer microcítico de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer ovárico o cáncer de pulmón de células no pequeñas. Otra realización proporciona una composición farmacéutica que comprende una forma sólida descrita en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los solicitantes describen en el presente documento una nueva forma sólida del Compuesto I-1. A continuación, en la Tabla 2 se proporciona el nombre y la estequiometría de la forma sólida:

10

Tabla 2

Ejemplo	Formas	Estequiometría
Ejemplo 2	Base libre anhidra del Compuesto I-1	N/D
Ejemplo 3	Hidrato del Compuesto I-1	1:3
Ejemplo 4	Ácido tartárico del Compuesto I-1	1:1

### **Ejemplo 2: Compuesto I-1 (base libre anhidra)**

15 La base libre anhidra del Compuesto I-1 puede prepararse de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 1, Etapa 4**.

#### XRPD del Compuesto I-1 (base libre anhidra)

20 El patrón de XRPD de la base anhidra del compuesto I-1 se registró a temperatura ambiente en modo de reflexión usando un difractómetro *PANalytical* equipado con una fuente de tubo Emyrean y un detector PIXcel 1D (*PANalytical*, Países Bajos). El generador de rayos X se hizo funcionar a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. La muestra de polvo se puso en un soporte de silicio. Los datos se registraron a lo largo de un intervalo 3°-39° 2 theta con un tamaño de etapa de 0,013° y un tiempo de permanencia de 0,5 s por etapa. La Figura 1a muestra el difractograma de rayos X en polvo de la muestra que es característico de una sustancia farmacológica cristalina.

25

Picos de XRPD representativos de la base libre anhidra del Compuesto I-1:

Picos de XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	8,704	35,67
2*	9,8727	100
3*	12,7565	34,37
4*	15,4224	31,96
5*	16,9295	29,04
6	17,4518	6,14
7	18,6901	21,74
8	20,5734	9,04
9	21,2755	9,98
10	21,7139	5,54
11*	23,0565	29,6
12	24,3907	14,96
13	25,9089	3,38
14*	27,8453	28,56
15*	28,9558	17,14
16*	30,1162	9,76
17	31,7775	6,85
18	32,2508	2,88
19	33,04	3,17
20	33,7887	4,71
21	36,5878	2,64
22	37,6243	0,33

30 Análisis térmico del Compuesto I-1 (base libre anhidra)

Se realizó un análisis termogravimétrico de la base libre anhidra del compuesto I-1 para determinar el porcentaje de pérdida de peso en función de la temperatura usando el TGA Discovery (TA Instruments Trios). Una muestra (2,84 mg) se añadió a una bandeja de aluminio tarada previamente y se calentó de temperatura ambiente a 400 °C a 10 °C/min.

35 Los resultados del TGA observados en la Figura 2a muestran muy poca pérdida de peso observada antes de la fusión

o degradación térmica. De temperatura ambiente a 261 °C, la pérdida de peso es 0,60 %. La temperatura de aparición de fusión/degradación es 299 °C.

#### Calorimetría de exploración diferencial del Compuesto I-1 (base libre anhidra)

5 La calorimetría de exploración diferencial de la base libre del compuesto I-1 se midió usando el DSC Q2000 de TA Instruments. Una muestra (1,71 mg) se pesó en un recipiente de aluminio perforado hermético y se calentó de temperatura ambiente a 400 °C a 10 °C/min. Los resultados de la DSC observados en la Figura 3a muestran una sola endotermia de fusión a 302 °C (inicio).

#### Ejemplo 3: Compuesto I-1 (hidrato)

15 La base libre anhidra del Compuesto I-1, preparada de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 1, Etapa 4**, se suspendió en agua o mezclas de disolvente orgánico y agua para producir el hidrato del Compuesto I-1.

#### XRPD del Compuesto I-1 (hidrato)

20 El patrón de XRPD del hidrato del Compuesto I-1 se registró a temperatura ambiente en modo de reflexión usando a un difractómetro *PANalytical* equipado con una fuente de tubo Empyrean y un detector PIXcel 1D (*PANalytical*, Países Bajos). El generador de rayos X se hizo funcionar a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. La muestra de polvo se puso en un soporte de silicio. Los datos se registraron a lo largo de un intervalo 3°-39° 2 theta con un tamaño de etapa de 0,013° y un tiempo de permanencia de 0,5 s por etapa. La Figura 1b muestra el difractograma de rayos X en polvo de la muestra que es característico de una sustancia farmacológica cristalina.

25 Picos de XRPD representativos del hidrato del Compuesto I-1:

Picos de XRPD	Ángulo (2-Theta ± 0,2)	Intensidad %
1	7,5	100,0
*2	27,5	52,7
3	6,4	43,1
*4	20,6	23,2
5	27,9	22,4
6	18,3	16,2
7	17,1	15,2
*8	9,7	13,5
9	30,3	13,4
10	11,8	12,8
11	28,5	12,8
12	15,6	12,7
13	16,7	11,6
14	18,7	10,8
15	22,8	10,3

#### Análisis térmico del Compuesto I-1 (hidrato)

30 Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) del hidrato del Compuesto I-1 para determinar el porcentaje de pérdida de peso en función de la temperatura usando el TGA Discovery (TA Instruments Trios). Una muestra (4,74 mg) se añadió a una bandeja de aluminio tarada previamente y se calentó de temperatura ambiente a 400 °C a 10 °C/min. Los resultados del TGA observados en la Figura 2b muestran una gran pérdida de peso del 12,6 % por debajo de 100 °C. Esta pérdida de peso corresponde a aproximadamente 3 equivalentes molares de agua. La pérdida de peso posterior por encima de 250 °C es resultado de la fusión y degradación.

#### Calorimetría de exploración diferencial del Compuesto I-1 (hidrato)

40 La calorimetría de exploración diferencial (DSC) del hidrato del Compuesto I-1 se midió usando el DSC Q2000 de TA Instruments. Una muestra (2,78 mg) se pesó en un recipiente hermético de aluminio perforado y se calentó de temperatura ambiente a 370 °C a 10 °C/min. Los resultados de la DSC observados en la Figura 3b muestran una amplia endotermia de desolvatación por debajo de 100 °C, seguido de una recristalización de exotermia para la base libre anhidra del Compuesto I-1 entre 100-150 °C. El pico endotérmico entre 300-305 °C indica la fusión de la base libre anhidra del Compuesto I-1.

#### Ejemplo 4: Compuesto I-1 (ácido tartárico)

La base libre anhidra del Compuesto I-1, preparada de acuerdo con los métodos descritos en el **Ejemplo 1, Etapa 4**, se suspendió con ácido tartárico y etanol para producir el ácido tartárico del Compuesto I-1.

#### XRPD del Compuesto I-1 (ácido tartárico)

5 El patrón de XRPD de ácido tartárico del Compuesto I-1 se registró a temperatura ambiente en modo de reflexión usando un difractorómetro *PANalytical* equipado con una fuente de tubo Emyrean y un detector PIXcel 1D (*PANalytical*, Países Bajos). El generador de rayos X se hizo funcionar a un voltaje de 45 kV y una corriente de 40 mA. La muestra de polvo se puso en un soporte de silicio. Los datos se registraron a lo largo de un intervalo  $4,5^\circ - 39^\circ 2\theta$  con un tamaño de etapa de  $0,013^\circ$  y un tiempo de permanencia de 299,6 s por etapa. La Figura 1c muestra el difractograma de rayos X en polvo de la muestra que es característico de una sustancia farmacológica cristalina.

Picos de XRPD representativos del ácido tartárico del Compuesto I-1:

Picos de XRPD	Ángulo (2-Theta $\pm$ 0,2)	Intensidad %
*1	7,1	100,0
*2	18,3	36,7
3	19,2	36,2
*4	13,2	29,2
5	28,0	25,8
6	24,8	24,2
7	20,3	20,3
8	22,2	16,9
9	28,9	16,4
10	23,7	15,7
11	28,4	14,3
12	10,6	14,1
13	10,3	12,0

#### Análisis térmico del Compuesto I-1 (ácido tartárico)

15 Se realizó un análisis termogravimétrico (TGA) del ácido tartárico del Compuesto I-1 para determinar el porcentaje de pérdida de peso en función de la temperatura usando el TGA Discovery (TA Instruments Trios). Una muestra (3,35 mg) se añadió a una bandeja de aluminio tarada previamente y se calentó de temperatura ambiente a  $330^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Los resultados del TGA observados en la Figura 2c muestran pérdidas de peso en tres etapas del 12,4 %, 12,6 % y 8,5 % entre  $150-330^\circ\text{C}$ .

#### Calorimetría de exploración diferencial del Compuesto I-1 (ácido tartárico)

25 La calorimetría de exploración diferencial (DSC) del ácido tartárico del Compuesto I-1 se midió usando el DSC Q2000 de TA Instruments. Una muestra (1,08 mg) se pesó en un recipiente hermético de aluminio perforado y se calentó de temperatura ambiente a  $350^\circ\text{C}$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Los resultados de la DSC observados en la Figura 3c muestran los primeros 2 picos de exotermia entre  $200-275^\circ\text{C}$  correspondientes a las primeras 2 etapas de pérdida de peso en TGA, y el último pico endotérmico por encima de  $275^\circ\text{C}$  correspondiente a la última etapa de pérdida de peso en TGA.

#### Ejemplo 5: Ensayo de inhibición celular de ATR:

35 Los compuestos se pueden explorar respecto de su capacidad para inhibir la ATR intracelular utilizando un ensayo de microscopía de inmunofluorescencia para detectar la fosforilación de la histona H2AX en el sustrato de ATR en células tratadas con hidroxurea. Se sembraron en placas las células HT29 a 14.000 células por pocillo en placas negras de 96 pocillos para obtención de imágenes (BD 353219) en medio 5A de McCoy (Sigma M8403) suplementado con suero fetal bovino al 10% (JRH Biosciences 12003), solución de penicilina/estreptomocina diluida a 1:100 (Sigma P7539) y L-glutamina 2 mM (Sigma G7513) y se dejaron adherir durante la noche a  $37^\circ\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Después, se añadieron los compuestos al medio celular a partir de una concentración final de  $25\ \mu\text{M}$  en diluciones seriadas de factor 3 y las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Después de 15 min, se añadió hidroxurea (Sigma H8627) a una concentración final de 2 mM.

45 Tras 45 min de tratamiento con hidroxurea, se lavaron las células en PBS, se fijaron durante 10 min en formaldehído al 4 % diluido en PBS (Polysciences Inc 18814), se lavaron en Tween-20 al 0,2 % en PBS (tampón de lavado) y se permeabilizaron durante 10 min en Triton X-100 al 0,5 % en PBS, todo a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las células una vez en tampón de lavado y se bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente en suero de cabra al 10 % (Sigma G9023) diluido en tampón de lavado (tampón de bloqueo). Para detectar los niveles de

fosforilación de H2AX, las células se incubaron a continuación durante 1 h a temperatura ambiente en anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra histona H2AX fosforilada en Ser139; Upstate 05-636) diluido a 1:250 en tampón de bloqueo. A continuación se lavaron las células cinco veces en tampón de lavado antes de la incubación durante 1h a temperatura ambiente en la oscuridad en una mezcla de anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra conjugado con Alexa Fluor 488 dirigido contra Ig de ratón; Invitrogen A11029) y tinción de Hoechst (Invitrogen H3570); diluido a 1:500 y 1:5000, respectivamente, en tampón de lavado. A continuación se lavaron las células cinco veces en tampón de lavado y finalmente, se añadieron 100ul de PBS a cada pocillo antes de la obtención de imágenes.

Se tomaron imágenes de las células con la intensidad de Alexa Fluor 488 y Hoechst utilizando el dispositivo BD Pathway 855 Bioimager y el software Attovision (BD Biosciences, Versión 1.6/855) para cuantificar H2AX fosforilada en Ser139 y la tinción del ADN, respectivamente. A continuación se calculó para cada pocillo el porcentaje de núcleos positivos para H2AX fosforilada en una composición de 9 imágenes a un aumento de 20x utilizando el software BD Image Data Explorer (BD Biosciences Versión 2.2.15). Los núcleos positivos para H2AX fosforilada se definen como regiones de interés positivas para Hoechst que contienen la intensidad Alexa Fluor 488 a 1,75 veces la intensidad promedio de Alexa Fluor 488 en células no tratadas con hidroximetilurea. El porcentaje de núcleos positivos para H2AX se representa finalmente frente a la concentración de cada compuesto y se determinan las CI50 para la inhibición de ATR intracelular utilizando el software Prism (GraphPad Prism versión 3.0cx para Macintosh, GraphPad Software, San Diego California, EE.UU.).

Se pueden ensayar también los compuestos descritos en el presente documento de acuerdo con otros métodos conocidos en la materia (véase Sarkaria et al, "Inhibition of ATM and ATR Kinase Activities by the Radiosensitizing Agent, Caffeine: *Cancer Research* 59: 4375-5382 (1999); Hickson et al, "Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM" *Cancer Research* 64: 9152-9159 (2004); Kim et al, "Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members" *The Journal of Biological Chemistry*, 274(53): 37538-37543 (1999); y Chiang et al, "Determination of the catalytic activities of mTOR and other members of the phosphoinositide-3-kinase-related kinase family" *Methods Mol. Biol.* 281:125-41 (2004)).

#### **Ejemplo 6: Ensayo de inhibición de ATR:**

Se exploraron los compuestos respecto de su capacidad para inhibir la ATR cinasa utilizando un ensayo de incorporación de fosfato radiactivo. Se llevaron a cabo los ensayos en una mezcla de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y DTT 1 mM. Las concentraciones finales de sustrato son de 10 μM [<sup>33</sup>P]ATP (3mCi 33P ATP/mmol ATP, Perkin Elmer) y 800 μM de péptido diana (ASELPASQPQPFSAKKK).

Se llevaron a cabo los ensayos a 25°C en presencia de ATR 5 nM de longitud completa. Se preparó una solución madre de tampón de ensayo que contenía todos los reactivos relacionados anteriormente, con la excepción de ATP y el compuesto de ensayo de interés. Se dispusieron 13,5 μl de la solución madre en una placa de 96 pocillos seguido por la adición de 2 μl de diluciones en serie que contenían solución madre de DMSO del compuesto de ensayo (comenzando normalmente desde una concentración final de 15 μM con 3 diluciones en serie) por duplicado (concentración final de DMSO al 7 %). La placa se preincubó durante 10 minutos a 25°C y se inició la reacción mediante la adición de 15 μl de [<sup>33</sup>P]ATP (concentración final 10 μM).

La reacción se detuvo después de 24 horas mediante la adición de 30 μl de ácido fosfórico 0,1M que contenía ATP 2 mM. Una placa de 96 pocillos con un filtro de fosfo celulosa multicriba (Millipore, n.º de Cat. MAPHN0B50) se pretrató con 100 μl de ácido fosfórico 0,2 M antes de la adición de 45 μl de la mezcla de detención del ensayo. Se lavó la placa con 5 x 200 μl de ácido fosfórico 0,2 M. Después de secarse, se añadieron 100 μl del cóctel de centelleo en medio líquido "SuperMix" (Perkin Elmer) al pocillo antes del recuento por centelleo (1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Wallac).

Tras eliminar los valores de fondo promedio de todos los puntos de datos, se calcularon los datos de Ki(app) a partir del análisis de regresión no lineal de los datos de la velocidad inicial utilizando el paquete de software Prism (GraphPad Prism versión 3.0cx para Macintosh, GraphPad Software, San Diego California, EE.UU.).

En general, los compuestos de la presente invención son eficaces para inhibir ATR. El compuesto I-1 inhibe ATR a valores de Ki por debajo de 1 μM.

#### **Ejemplo 7: Ensayo de sensibilización a cisplatino**

Los compuestos pueden explorarse respecto de su capacidad para sensibilizar a células de cáncer colorrectal HCT116 al cisplatino usando un ensayo de viabilidad celular de 96h (MTS). Las células HCT116, que poseen un defecto en la señalización de ATM al cisplatino (véase, Kim et al.; *Oncogene* 21:3864 (2002); véase también, Takemura et al.; *JBC* 281:30814 (2006)) se sembraron en placas a razón 470 células por pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar 3596) en 150μl de medio 5A de McCoy (Sigma M8403) suplementado con suero fetal bovino al 10% (JRH Biosciences 12003), se diluyó 1:100 una solución de penicilina/estreptomina (Sigma P7539), y L-glutamina 2 mM (Sigma G7513) y se dejó adherir durante la noche a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación se añadieron simultáneamente los compuestos y el cisplatino al medio celular en diluciones en serie de factor 2 a partir de una concentración final



superior de 10  $\mu\text{M}$  como una matriz completa de concentraciones en un volumen celular final de 200  $\mu\text{l}$  y las células se incubaron a continuación a 37°C en  $\text{CO}_2$  al 5%. Después de 96 h, se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de reactivo MTS (Promega G358a) a cada pocillo y se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm utilizando un lector SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) y puede notificarse la concentración de compuesto requerida para reducir la  $\text{CI}_{50}$  de cisplatino solo en al menos 3 veces (hasta el primer decimal).

En general, Los compuestos de la presente invención son eficaces para sensibilizar a las células cancerosas frente al cisplatino. El compuesto I-1 tiene valores de sensibilización al cisplatino de <0,2  $\mu\text{M}$ .

#### **Ejemplo 8: Actividad con HCT116 de agente único**

Pueden explorarse los compuestos respecto de su actividad como agente único contra células de cáncer colorrectal HCT116 usando un ensayo de viabilidad celular de 96h (MTS). Se siembran HCT116 a razón de 470 células por pocillo en placas de poliestireno de 96 pocillos (Costar 3596) en 150  $\mu\text{l}$  de medio 5A de McCoy (Sigma M8403) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (JRH Biosciences 12003), solución de penicilina/estreptomicina diluida a 1:100 (Sigma P7539) y L-glutamina 2 mM (Sigma G7513) y se dejaron adherir durante la noche a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 %. A continuación se añadieron los compuestos al medio celular en diluciones en serie de factor 2 a partir de una concentración final superior de 10  $\mu\text{M}$  como una matriz completa de concentraciones en un volumen celular final de 200  $\mu\text{l}$  y las células se incubaron a continuación a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Después de 96 h, se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de reactivo MTS (Promega G358a) a cada pocillo y se incubaron las células durante 1 hora a 37 °C en  $\text{CO}_2$  al 5 %. Finalmente, se midió la absorbancia a 490nm usando un lector SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) y pueden calcularse los valores de  $\text{CI}_{50}$ .

#### **Ejemplo 9: Ensayo de inhibición del complejo ATR**

Los compuestos se exploraron respecto de su capacidad para inhibir a ATR cinasa, en presencia de las proteínas asociadas ATRIP, CLK2 y TopBP1, usando un ensayo de incorporación de fosfato radiactivo. Se llevaron a cabo los ensayos en una mezcla de Tris/HCl 50 mM (pH 7,5),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, y DTT 1 mM. Las concentraciones finales de sustrato fueron 10  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP (3,5  $\mu\text{Ci}$  33P ATP/nmol ATP, Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.) y péptido diana 800  $\mu\text{M}$  (ASELPASQPQPFSAKKK, Isca Biochemicals, Cambridgeshire, Reino Unido).

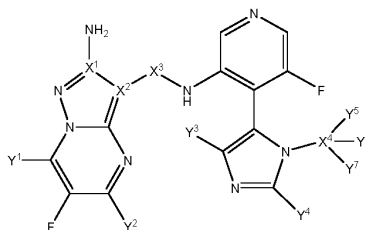
Se llevaron a cabo los ensayos a 25°C en presencia de ATR de longitud completa 4 nM, ATRIP de longitud completa 40 nM, CLK2 de longitud completa 40 nM y TopBP1 600 nM (A891-S1105). Se preparó una solución madre de enzima que contenía todos los reactivos indicados anteriormente, con la excepción del péptido diana, ATP y el compuesto de ensayo de interés. Esta solución madre de enzima se preincubó durante 30 minutos a 25 °C. Se dispusieron 8,5  $\mu\text{l}$  de la solución madre de enzima en una placa de 96 pocillos, seguido de la adición de 5  $\mu\text{l}$  de péptido diana y de 2  $\mu\text{l}$  de solución madre de DMSO que contenía diluciones seriadas del compuesto de ensayo (comenzando normalmente a partir de una concentración final de 1,5  $\mu\text{M}$  con diluciones seriadas de factor 2,5) por duplicado (concentración final de DMSO del 7 %). La placa se preincubó durante 10 minutos a 25 °C y se inició la reacción mediante la adición de 15  $\mu\text{l}$  de [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP (concentración final 10  $\mu\text{M}$ ).

La reacción se detuvo después de 20 horas mediante la adición de 30  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico 0,3 M que contenía ATP 2 mM. Se pretrató una placa de filtro de fosfocelulosa de 96 pocillos (Multiscreen HTS MAPHNOB50, Merck-Millipore, Massachusetts, EE. UU.) con 100  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico 0,1 M antes de la adición de 45  $\mu\text{l}$  de la mezcla de ensayo detenida. Se lavó la placa con 5 x 200  $\mu\text{l}$  de ácido fosfórico 0,1 M. Después de secarse, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del cóctel de centelleo en medio líquido 'SuperMix' (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.) a los pocillos antes del recuento por centelleo (Wallac 1450 Microbeta Liquid Scintillation Counter, Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.).

Tras eliminar los valores de fondo promedio de todos los puntos de datos, se calcularon los datos de  $\text{K}_i(\text{app})$  a partir del análisis de regresión no lineal de los datos de la velocidad inicial utilizando el paquete de software Prism (GraphPad Prism versión 6.0c para Macintosh, GraphPad Software Inc., San Diego, EE. UU.).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I-A:



I-A

5

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, en la que:

10 cada Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> es independientemente hidrógeno o deuterio; con la condición de que al menos uno de Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> es deuterio;

cada X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>4</sup> es independientemente <sup>12</sup>C o <sup>13</sup>C; y

X<sup>3</sup> es independientemente -<sup>12</sup>C(O)- o -<sup>13</sup>C(O)-.

15

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que

a) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son independientemente deuterio o hidrógeno; e Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio;

b) Y<sup>1</sup> e Y<sup>2</sup> son independientemente deuterio o hidrógeno; e Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio;

20

c) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son independientemente deuterio o hidrógeno; e Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son deuterio; o

d) Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son independientemente deuterio o hidrógeno; e Y<sup>2</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que

25

a) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>4</sup> es <sup>13</sup>C;

b) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>1</sup> y X<sup>4</sup> son <sup>13</sup>C;

c) Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>2</sup> es deuterio; y X<sup>4</sup> es <sup>13</sup>C;

d) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> son hidrógeno; Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C;

e) Y<sup>1</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>2</sup> es deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C; o

30

f) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; Y<sup>4</sup> es deuterio; y X<sup>1</sup> es <sup>13</sup>C.

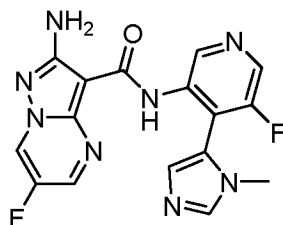
4. El compuesto de la reivindicación 1, en el que

a) Y<sup>1</sup>, Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son hidrógeno; y X<sup>3</sup> es -<sup>13</sup>C(O)-; o

35

b) Y<sup>1</sup> es hidrógeno; Y<sup>2</sup>, Y<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup>, Y<sup>5</sup>, Y<sup>6</sup> e Y<sup>7</sup> son deuterio; X<sup>2</sup> es <sup>13</sup>C; y X<sup>3</sup> es -<sup>13</sup>C(O)-.

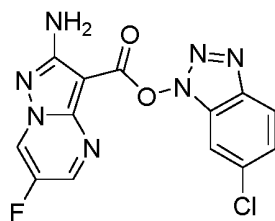
5. Un proceso para preparar un compuesto de fórmula I-1:



I-1

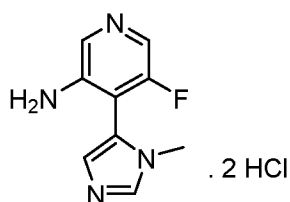
40

que comprende la etapa de hacer reaccionar el compuesto de fórmula 6b:



**6b**

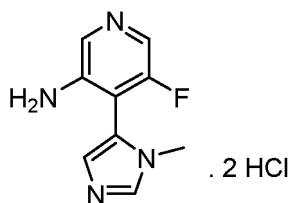
con un compuesto de fórmula **11**:



**11**

5

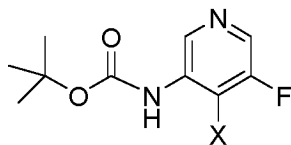
en condiciones adecuadas para formar un enlace de amida; opcionalmente comprendiendo adicionalmente la etapa de preparar un compuesto de fórmula **11**:



**11**

10

haciendo reaccionar el compuesto de fórmula **9**:

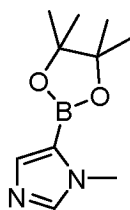


**9**

15

en la que X es halógeno,

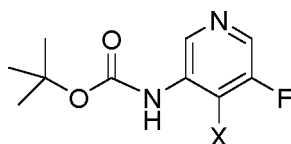
con un compuesto de fórmula **10**:



**10**

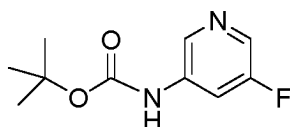
en condiciones de acoplamiento cruzado catalizado por metal adecuadas para formar un aducto que contiene un grupo amina protegido; y

- 5 someter el aducto resultante a condiciones de desprotección adecuadas; opcionalmente comprendiendo adicionalmente la etapa de preparar un compuesto de fórmula 9:



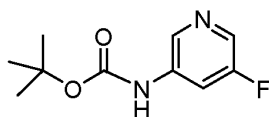
**9**

- 10 haciendo reaccionar el compuesto de fórmula 8:



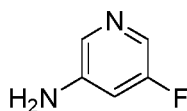
**8**

- 15 en condiciones de halogenación adecuadas; y opcionalmente comprendiendo adicionalmente la etapa de preparar un compuesto de fórmula 8:



**8**

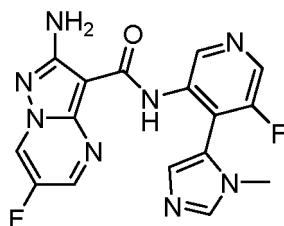
- 20 haciendo reaccionar un compuesto de fórmula 7:



**7**

en condiciones adecuadas para generar un grupo amina protegido.

- 25 6. Una forma sólida de un compuesto de fórmula I-1:



I-1

en la que la forma es la base libre anhidra del Compuesto I-1.

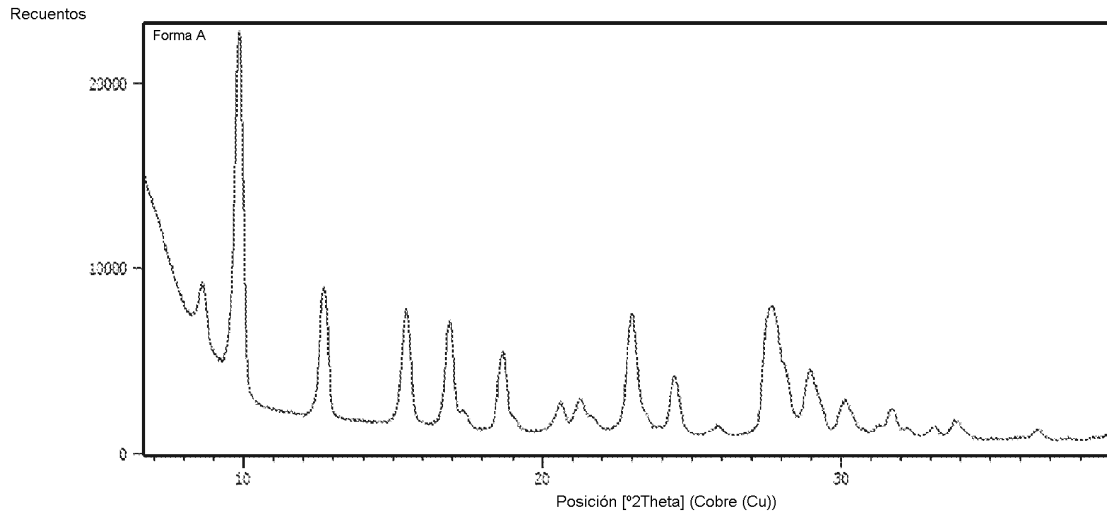
- 5 7. La forma sólida de la reivindicación 6, en la que la forma es la base libre anhidra del Compuesto I-1 cristalina, y la forma sólida se caracteriza por uno o más picos expresados en 2-theta  $\pm$  0,2 a 9,9, 12,8, 15,4, 17,0, 23,1, 27,8, 29,0 y 30,1 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido usando radiación de CuKalfa.
- 10 8. La forma sólida de la reivindicación 7, caracterizada por que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo obtenido usando radiación de CuKalfa, que comprende picos expresados en 2-theta  $\pm$  0,2 a

Ángulo (2-Theta $\pm$ 0,2)	Intensidad %
8,704	35,67
9,8727	100
12,7565	34,37
15,4224	31,96
16,9295	29,04
17,4518	6,14
18,6901	21,74
20,5734	9,04
21,2755	9,98
21,7139	5,54
23,0565	29,6
24,3907	14,96
25,9089	3,38
27,8453	28,56
28,9558	17,14
30,1162	9,76
31,7775	6,85
32,2508	2,88
33,04	3,17
33,7887	4,71
36,5878	2,64
37,6243	0,33

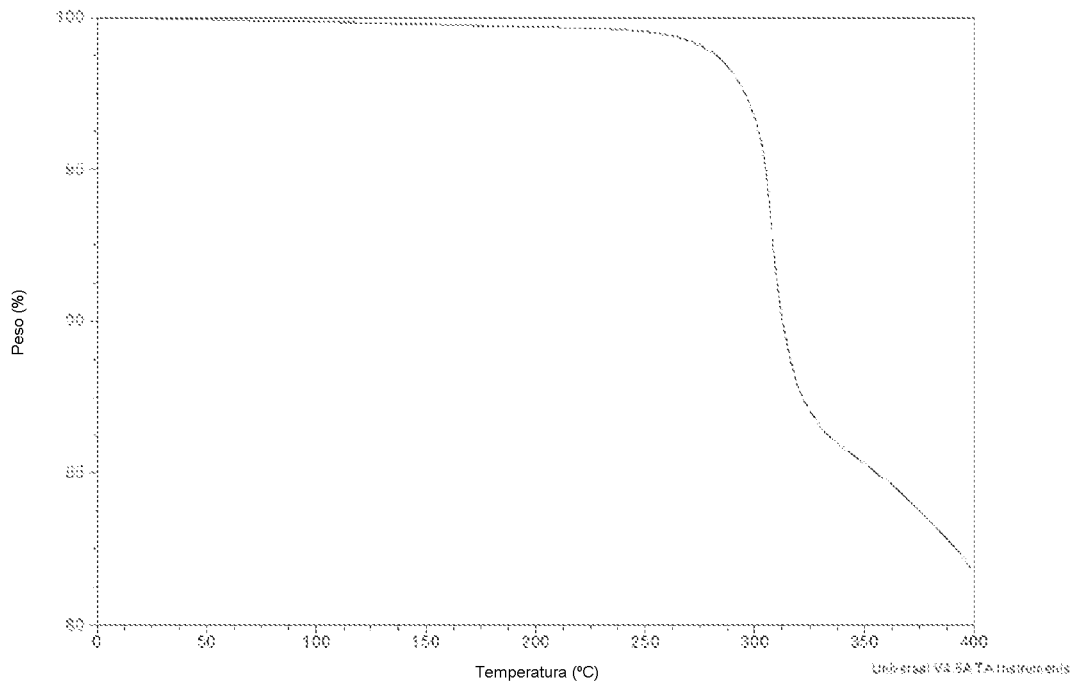
- 15 9. El proceso de la reivindicación 5, en el que la etapa de hacer reaccionar un compuesto de fórmula **6b** con un compuesto de fórmula **11** sucede en presencia de un disolvente y una base orgánica.
10. El proceso de la reivindicación 9, en el que el disolvente se selecciona entre NMP, DMF o anisol.
11. El proceso de la reivindicación 9, en el que la base orgánica es una amina alifática.
- 20 12. El proceso de la reivindicación 11, en el que la amina alifática se selecciona entre trietilamina o DIPEA.
13. El proceso de la reivindicación 5, en el que las condiciones de acoplamiento cruzado catalizado por metal adecuadas incluyen un catalizador metálico, un disolvente adecuado y una base adecuada.
- 25 14. El proceso de la reivindicación 13, en el que el catalizador metálico es un catalizador de paladio.
15. El proceso de la reivindicación 14, en el que el catalizador de paladio se selecciona entre PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Pd(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub> y PdCl<sub>2</sub>(dppf).
- 30 16. El proceso de la reivindicación 13, en el que la base adecuada se selecciona entre fosfato potásico, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tBuOK y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

17. El proceso de la reivindicación 13, en el que el disolvente adecuado se selecciona entre DME, tetrahidrofurano, tolueno y etanol.

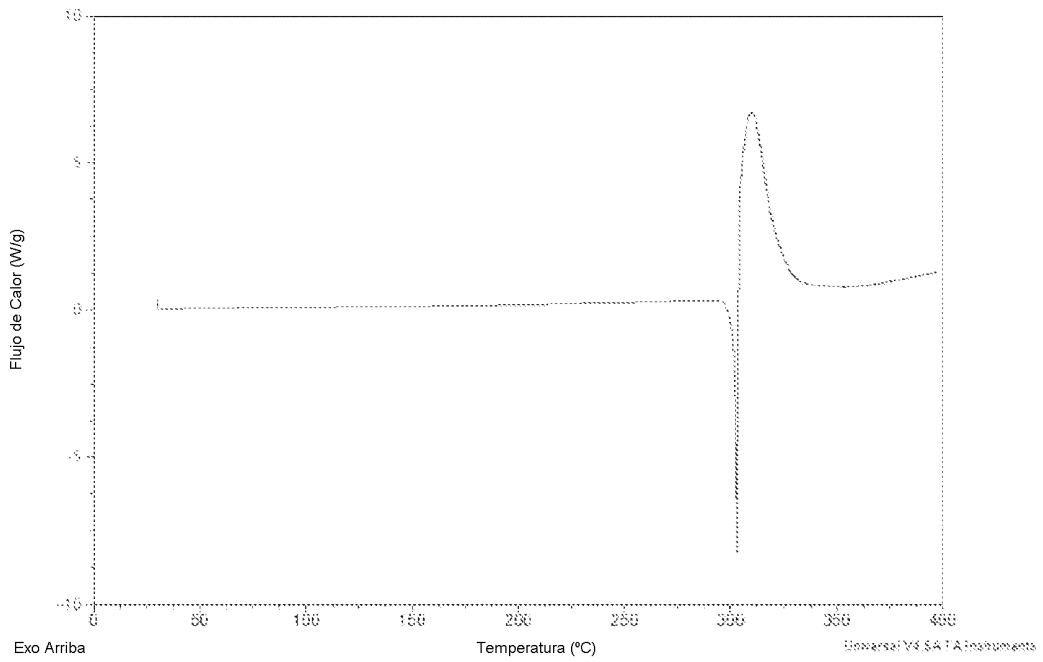
**FIGURA 1a: XRPD del Compuesto I-1 (base libre anhidra)**



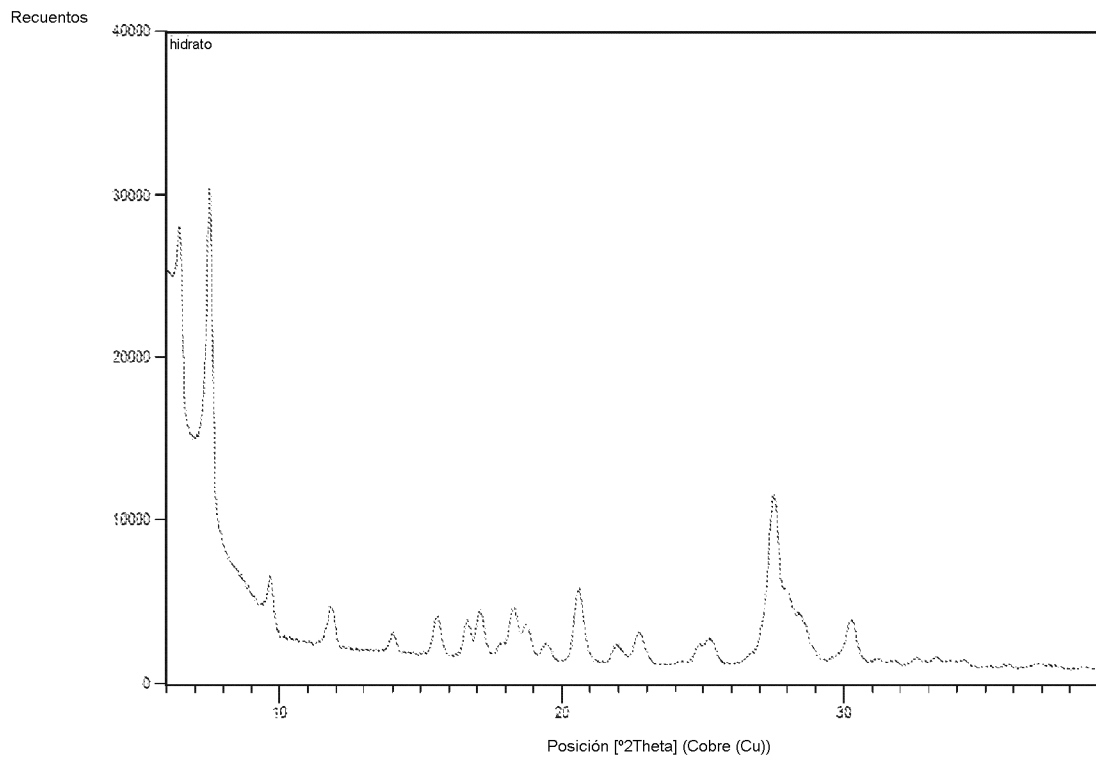
**FIGURA 2a: TGA del Compuesto I-1 (base libre anhidra)**



**FIGURA 3a: DSC del Compuesto I-1 (base libre anhidra)**

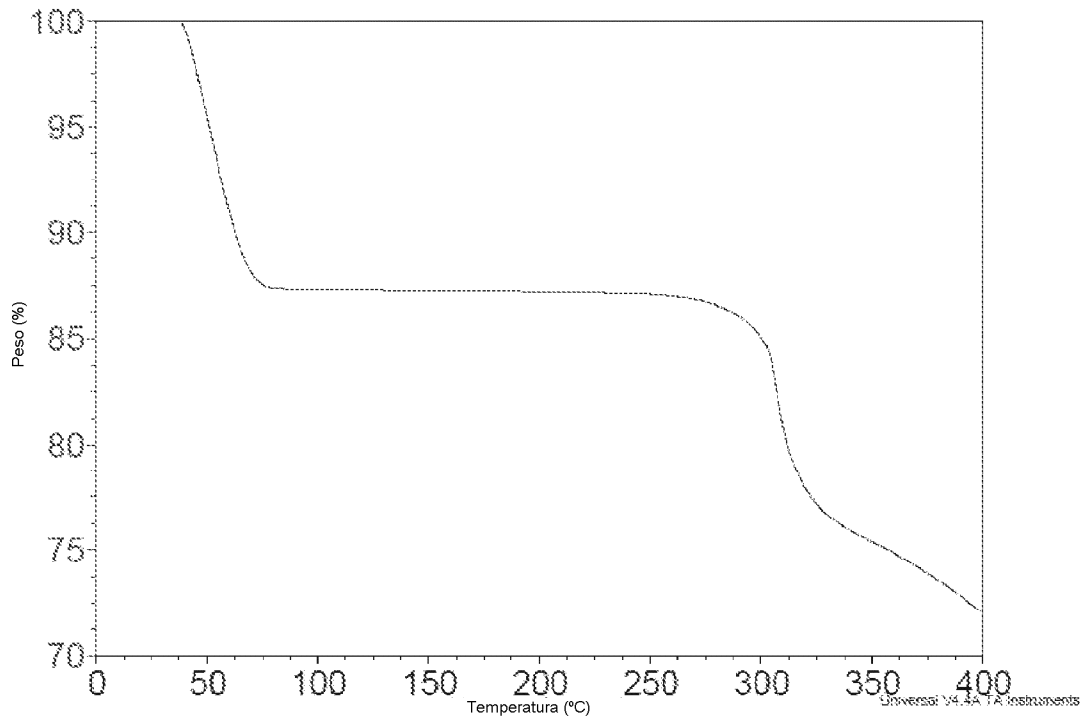


**FIGURA 1b: XRPD del Compuesto I-1 (hidrato)**

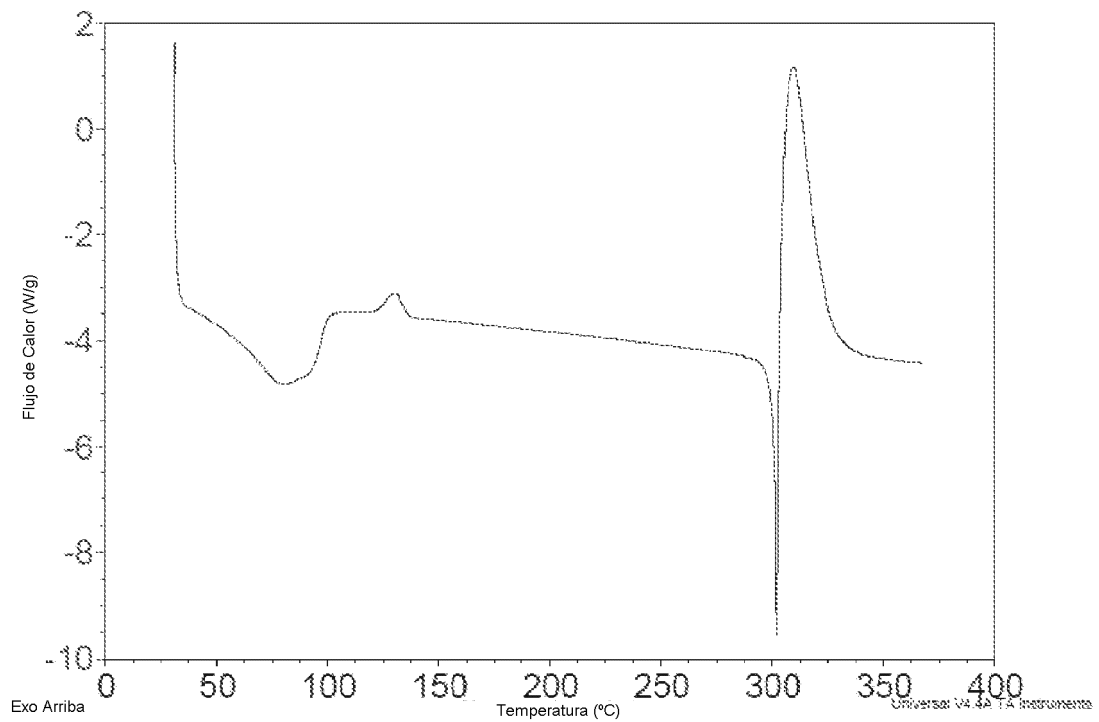




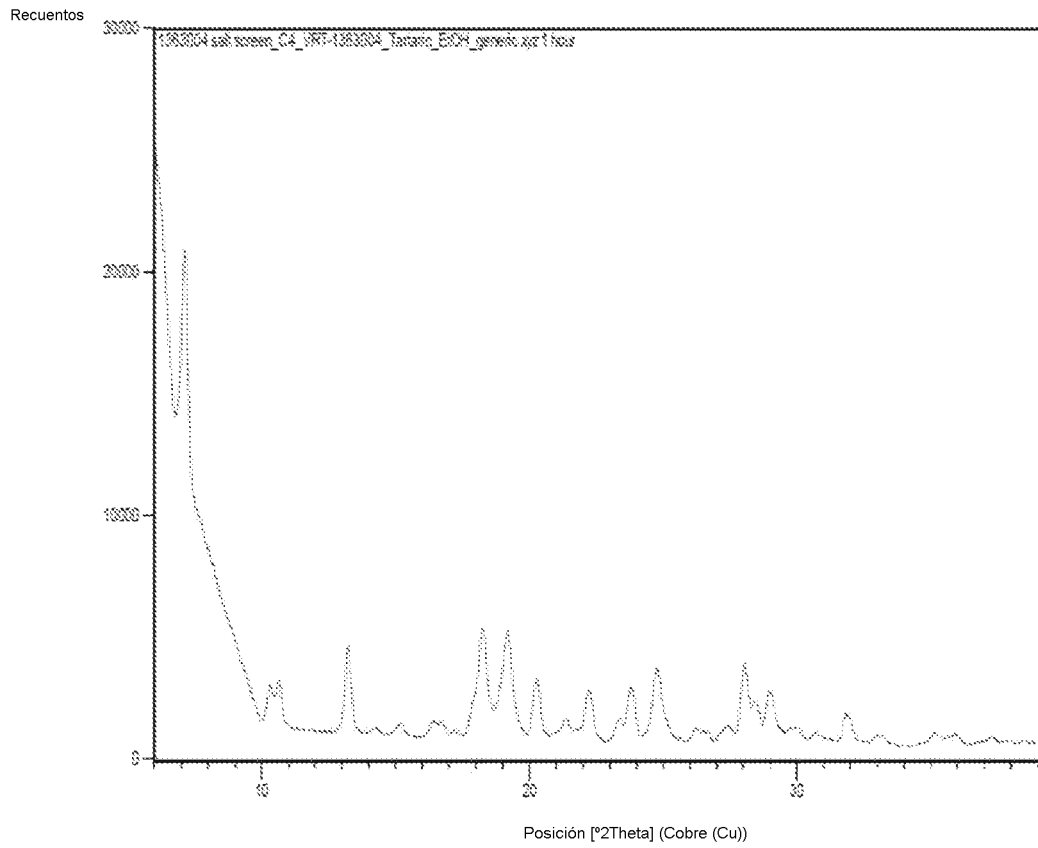
**FIGURA 2b: TGA del Compuesto I-1 (hidrato)**



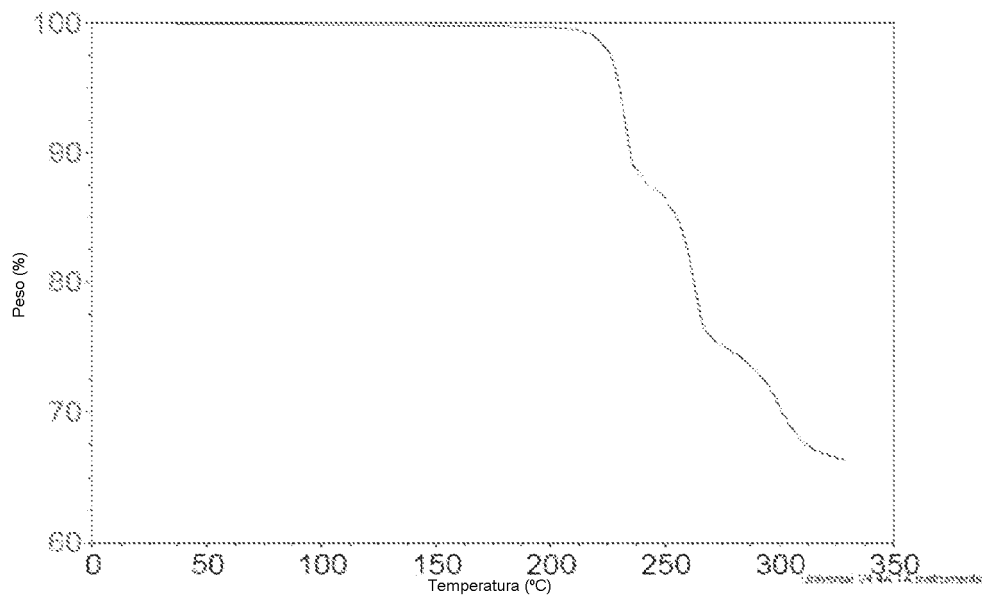
**FIGURA 3b: DSC del Compuesto I-1 (hidrato)**



**FIGURA 1c: XRPD del Compuesto I-1 (ácido tartárico)**



**FIGURA 2c: TGA del Compuesto I-1 (ácido tartárico)**



**FIGURA 3c: DSC del Compuesto I-1 (ácido tartárico)**

