

MODULADORES DEL CANAL DE POTASIO

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama prioridad a la Solicitud
5 Provisional de los Estados Unidos No. 62/449,270,
presentada el 23 de enero de 2017, cuyos contenidos
completos se incorporan aquí como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Entre los canales iónicos, los canales de potasio
son los más prevalentes y diversos, y se encuentran en una
variedad de células animales tales como tejido nervioso,
muscular, glandular, inmune, reproductivo y epitelial.
Estos canales permiten el flujo de potasio dentro y/o fuera
15 de la célula en ciertas condiciones. Estos canales están
regulados, por ejemplo, por sensibilidad al calcio,
compuerta de voltaje, segundos mensajeros, ligandos
extracelulares y sensibilidad a ATP.

Se sabe que la disfunción de los canales de
20 potasio y la disfunción por otras causas que influyen en
estos canales de potasio generan pérdida de control
celular, función fisiológica alterada y condiciones de la
enfermedad. Debido a su capacidad para modular la función
del canal iónico y/o recuperar la actividad del canal
25 iónico, los moduladores del canal de potasio se están
utilizando en el tratamiento farmacológico de un amplio
intervalo de enfermedades patológicas y tienen el potencial

de abordar una variedad aún más amplia de indicaciones terapéuticas.

Los canales de potasio activados por calcio de pequeña conductancia (canal de SK) son una subfamilia de
5 canales K^+ activados por Ca^{2+} y la familia de canales SK contiene 4 miembros: SK1, SK2, SK3 y SK4 (a menudo denominados conductancia intermedia). Las funciones fisiológicas de los canales de SK se han estudiado especialmente en el sistema nervioso, donde, por ejemplo,
10 son reguladores clave de la excitabilidad neuronal y de la liberación de neurotransmisores, y en el músculo liso, donde son cruciales para modular el tono vascular, musculatura bronco-traqueal, uretral, uterino o gastrointestinal.

15 Dadas estas implicaciones, los moduladores de moléculas pequeñas de los canales de iones de potasio podrían tener el potencial de tratar una gran variedad de enfermedades caracterizadas por la disfunción de los canales de iones de potasio y la disfunción por otras
20 causas que influyen en estos canales de potasio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se describen compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y composiciones farmacéuticas de
25 los mismos, que son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con la disfunción de los canales de ion potasio y disfunción de otras causas que influyen en

estos canales de potasio. (Véase, por ejemplo, el cuadro 1).

Se encontró que los compuestos descritos aquí tienen una o más de las siguientes propiedades
5 beneficiosas: alta solubilidad, alta fracción libre de cerebro, poca o ninguna inhibición de hERG, vida media *in vivo* extendida, buena biodisponibilidad, alta estabilidad microsomal del hígado, permeabilidad mejorada tal como la permeabilidad de la membrana artificial paralela (PAMPA)
10 y/o baja inhibición de Cyp. Véase, por ejemplo, los datos comparativos en los cuadros 2 y 3.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama que ilustra el efecto
15 del Compuesto 1 después de la dosificación oral (PO) en el temblor inducido por harmalina.

La figura 2 muestra la eficacia y la respuesta a la dosis del Compuesto 1 en porcentaje de potencia de movimiento.

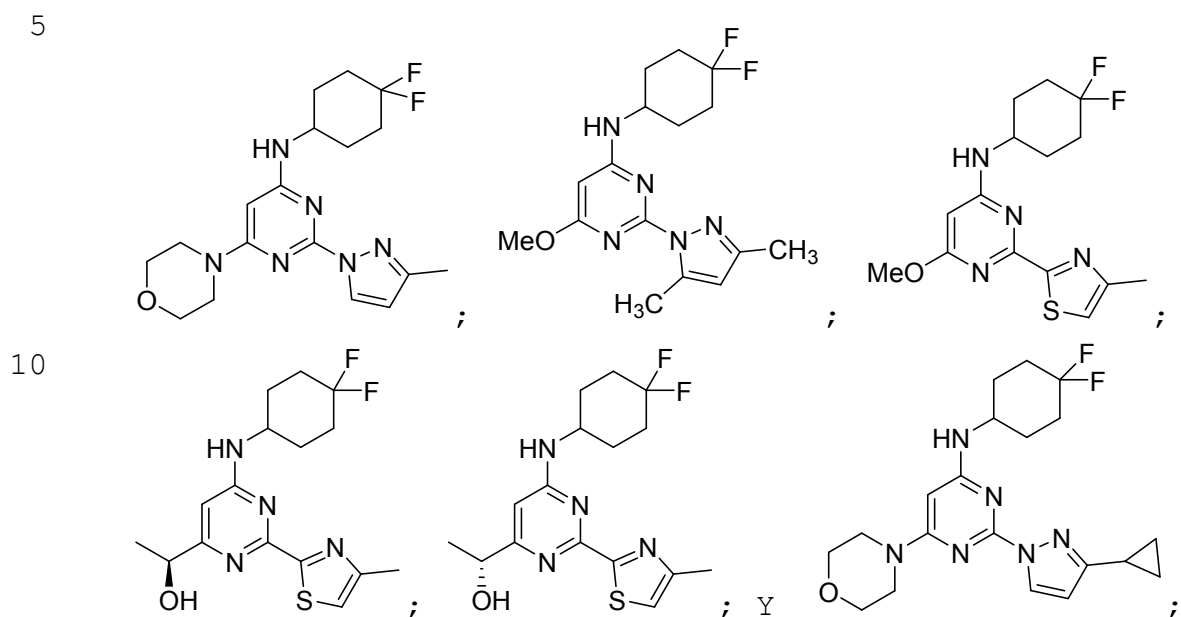
20 La figura 3 muestra los efectos del Compuesto 1 sobre la irregularidad en la activación de células de Purkinje en cortes *ex vivo* de ratones transgénicos SCA2 58Q.

La figura 4 muestra los efectos del Compuesto 1
25 en la ataxia de la línea de base en el modelo de ratón EA2 Tottering.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

1. Compuestos

Aquí se proporcionan compuestos de la fórmula:



o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

2. Definiciones

Como se usa aquí, los términos "sujeto" y "paciente" se pueden usar de manera intercambiable, y significa un mamífero que necesita tratamiento, por ejemplo, animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, ovejas, cabras y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, conejillos de indias y similares). Típicamente, el sujeto es un ser humano que necesita tratamiento.

Cuando la estereoquímica de un compuesto descrito se nombra o representa por su estructura, el estereoisómero nombrado o representado es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 99.9% en peso puro en relación con todos los otros estereoisómeros. El porcentaje en peso puro en relación con todos los otros estereoisómeros es la relación del peso de un estereoisómero sobre el peso de los otros estereoisómeros. Cuando un solo enantiómero se nombra o representa por su estructura, el enantiómero representado o nombrado es al menos 60%, 70%, 80%, 90%, 99% o 99.9% en peso ópticamente puro. El porcentaje de pureza óptica en peso es la relación del peso del enantiómero sobre el peso del enantiómero más el peso de su isómero óptico.

Cuando un compuesto descrito se nombra o representa con una estructura sin indicar la estereoquímica, y el compuesto tiene un centro quiral, debe entenderse que el nombre o la estructura engloba un enantiómero del compuesto libre del correspondiente isómero óptico y geométrico, una mezcla racémica del compuesto y mezclas enriquecidas en un enantiómero con respecto a su isómero óptico correspondiente.

Se incluyen las sales farmacéuticamente aceptables, así como las formas neutras de los compuestos descritos aquí. Para uso en medicinas, las sales de los compuestos se refieren a "sales farmacéuticamente aceptables" no tóxicas. Las formas de sal farmacéuticamente aceptables incluyen sales ácidas/aniónicas o

básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables. Las sales
básicas/catiónicas farmacéuticamente aceptables incluyen
las sales de sodio, potasio, calcio, magnesio,
dietanolamina, n-metil-D-glucamina, L-lisina, L- arginina,
5 amonio, etanolamina, piperazina y trietanolamina. Las sales
ácidas/aniónicas farmacéuticamente aceptables incluyen, por
ejemplo, el acetato, bencenosulfonato, benzoato,
bicarbonato, bitartrato, carbonato, citrato, diclorhidrato,
gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato,
10 bromhidrato, clorhidrato, malato, maleato, malonato,
mesilato, nitrato, salicilato, estearato, succinato,
sulfato, tartrato y tosilato.

El término "portador, adyuvante o vehículo
farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador,
15 adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad
farmacológica del compuesto con el que se formula. Los
portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente
aceptables que se pueden usar en las composiciones
descritas aquí incluyen, pero no se limitan a,
20 intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio,
lecitina, proteínas séricas, tales como la albúmina sérica
humana, sustancias tampón tal como fosfatos, glicina, ácido
sorbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos
parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales
25 o electrolitos, tales como sulfato de protamina, fosfato
hidrógeno disódico, fosfato hidrógeno de potasio, cloruro
de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de

magnesio, polivinilpirrolidona, Sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

5 Los términos "tratamiento", "tratar" y "que tratar" se refieren a revertir, aliviar, reducir la probabilidad de desarrollar o inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno, o uno o más de sus síntomas, como se describe aquí. En algunas modalidades, el tratamiento
10 puede administrarse después de que se hayan desarrollado uno o más síntomas, es decir, tratamiento terapéutico. En otras modalidades, el tratamiento puede administrarse en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un individuo susceptible antes del inicio
15 de los síntomas (por ejemplo, en vista de una historia de síntomas y/o en vista de factores genéticos u otros factores de susceptibilidad), es decir, tratamiento profiláctico. El tratamiento también puede continuarse después de que los síntomas se hayan resuelto, por ejemplo,
20 para prevenir o retrasar su recurrencia.

El término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" incluye una cantidad de un compuesto descrito aquí que provocará una respuesta biológica o médica de un sujeto.

25

3. Usos, Formulación y Administración

En algunas modalidades, los compuestos y

composiciones descritos aquí son útiles para tratar enfermedades y/o trastornos asociados con la actividad de los canales de potasio. Dichas enfermedades y/o trastornos incluyen, por ejemplo, condiciones neurodegenerativas y

5 neurológicas (por ejemplo, enfermedad de Parkinson, temblores, enfermedad de Alzheimer, demencia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), ataxia, ansiedad, depresión, trastornos de humor, déficit de memoria y atención, trastorno bipolar, psicosis, esquizofrenia, lesión cerebral

10 traumática y narcolepsia), enfermedad cardíaca y condiciones relacionadas (por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad cardíaca coronaria, angina de pecho y espasmos de las arterias coronarias), enfermedad metabólica y enfermedades de la vejiga (por ejemplo, espasmos

15 vesicales, incontinencia urinaria, obstrucción del flujo de la vejiga, disfunción gastrointestinal, síndrome del intestino irritable y diabetes), síntomas de abstinencia asociados con la terminación de la adicción y otras condiciones asociadas con la modulación de los canales de

20 potasio tal como, por ejemplo, enfermedades respiratorias, epilepsia, convulsiones, convulsiones de ausencia, espasmos vasculares, trastornos renales (por ejemplo, enfermedad renal poliquística), disfunción eréctil, diarrea secretoria, isquemia, isquemia cerebral, dismenorrea,

25 enfermedad de Reynaud, claudicación intermitente, síndrome de Sjorgren, arritmia, hipertensión, distrofia muscular miotónica, espasticidad, xerostomi, hiperinsulinemia, parto

premature, calvicie, cáncer, supresión inmunitaria, migraña y dolor.

La presente descripción también proporciona un método para modular la actividad de un canal de potasio en un sujeto que comprende el paso de administrar un compuesto descrito aquí. En otra modalidad, la presente descripción proporciona un método para modular positivamente un canal de SK2 en una célula que comprende el paso de poner en contacto la célula con un compuesto descrito aquí.

En un aspecto, los compuestos y composiciones proporcionados se usan para tratar temblores. Los temblores incluyen, pero no se limitan a reposo, temblores activo, postural, cinético, de intención, tarea específica e idiopáticos. En un aspecto, los compuestos y composiciones proporcionados se usan para tratar los temblores posturales y activos. Los ejemplos de temblores posturales y/o activos incluyen temblor esencial, parkinsonismo inducido por fármacos, temblor neuropático y temblores inducidos por toxinas (por ejemplo, abstinencia de alcohol o por exposición a metales pesados). En un aspecto, los compuestos y composiciones proporcionados se usan para tratar el temblor esencial.

La presente descripción proporciona además un método para tratar el temblor esencial en un sujeto que comprende el paso de administrar un compuesto o una sal o composición farmacéuticamente aceptable descrita aquí.

El temblor esencial es uno de los trastornos

neurológicos más comunes, que afecta a ~0.9% de la población general. El temblor esencial se caracteriza por un temblor de acción de las extremidades superiores y, menos comúnmente, de la cabeza, la voz y el tronco. Se puede identificar un historial familiar de temblor esencial en cerca de la mitad de los pacientes, lo que sugiere un componente genético. Beber alcohol a menudo reduce temporalmente el temblor.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o condición seleccionada de una enfermedad neurodegenerativa, demencia, enfermedad cardíaca, síntomas de abstinencia asociados con la terminación de la adicción, enfermedad metabólica y enfermedad de la vejiga. En otras modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o condición seleccionada de ataxia, distonía, enfermedad de Parkinson, isquemia, lesión cerebral traumática, esclerosis lateral amiotrófica, hipertensión, aterosclerosis, diabetes, arritmia, vejiga hiperactiva y los síntomas de abstinencia causados por la terminación del abuso de alcohol y otros fármacos de abuso. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar la ataxia. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un método para tratar la ataxia espinocerebelosa.

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un compuesto

descrito aquí; y un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden usar para tratar una o más de las enfermedades y condiciones descritas anteriormente.

Las composiciones descritas aquí pueden administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa aquí incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Las formas de dosificación líquidas, las preparaciones inyectables, las formas de dispersión sólida y las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto se incluyen aquí.

La cantidad de compuestos proporcionados que pueden combinarse con materiales portadores para producir una composición en una única forma de dosificación variará dependiendo del paciente a tratar y del modo particular de administración. En algunas modalidades, las composiciones proporcionadas pueden formularse de modo que se pueda administrar una dosificación de entre 0.01-100 mg/kg de peso corporal/día del compuesto proporcionado, tal como por ejemplo, 0.1-100 mg/kg de peso corporal/día, a un paciente que recibe estas composiciones.

También debe entenderse que una dosificación específica y un régimen de tratamiento para cualquier

paciente en particular dependerán de una variedad de factores, que incluyen la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la tasa de excreción, la combinación de fármacos, el juicio
 5 del médico tratante y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. La cantidad de un compuesto proporcionado en la composición también dependerá del compuesto particular en la composición.

10

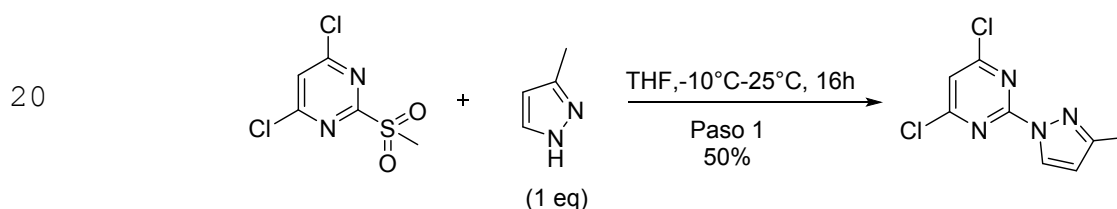
EJEMPLIFICACIÓN

Los ejemplos representativos que siguen están destinados a ayudar a ilustrar la presente descripción, y no pretenden, ni deben interpretarse para, limitar el alcance de la invención.

15

N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3-metil-1H-pirazol-1-il)-6-morfolinopirimidin-4-amina

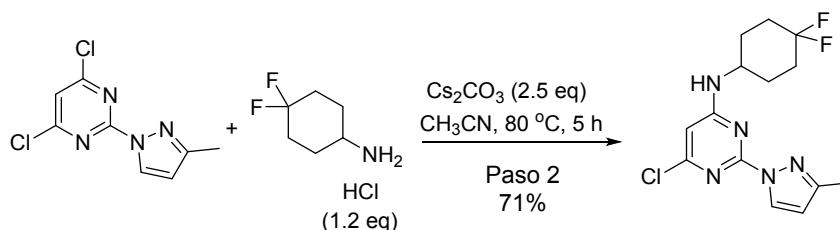
Paso 1:



Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con 4,6-
 25 dicloro-2-(metilsulfonil)pirimidina (20.0 g, 88.080 mmol, 1.0 equivalente) en tetrahidrofurano a -10°C y 3-metil-1H-pirazol (7.23 g, 88.080 mmol, 1.0 equivalente) se añadió

gota a gota durante un período de cinco minutos a través de una jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 25°C y se determinó la finalización de la reacción por TLC. La mezcla de reacción se repartió entre agua (500 ml) y acetato de etilo (500 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano como sistema solvente) para proporcionar 4,6-dicloro-2-(3-metilo-1H-pirazol-1-il)pirimidina (10.0 g, 43.859 mmol, 50% de rendimiento) como una forma pura blanca sólida. MS (MH⁺): m/z = 229.1.

15

Paso 2:

20

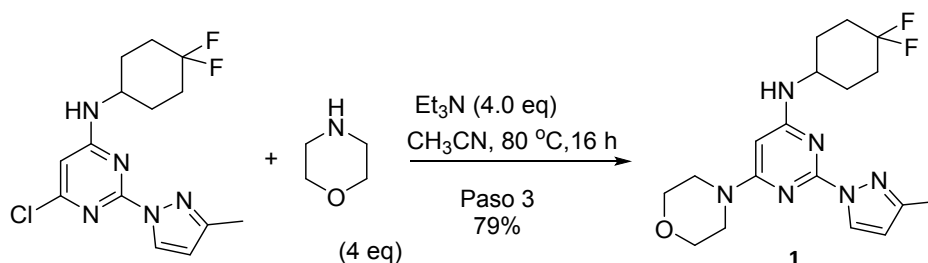
Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con 2,4-dicloro-6-metilpirimidina (11.0 g, 48.24 mmol, 1.0 equivalente), clorhidrato de 4,4-difluorociclohexan-1-amina (9.89 g, 57.89 mmol, 1.2 equivalentes), y Cs₂CO₃ (39.19 g, 120.61 mmol, 2.5 equivalentes) en acetonitrilo (200 ml). La mezcla de reacción se agitó durante cinco horas a 80°C y la

25

finalización de la reacción se determinó mediante TLC. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre agua (100 ml) y acetato de etilo (200 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano como sistema disolvente) para proporcionar 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexilo)-2-(3-metil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-4-amina (11.0 g, 33.62 mmol, 71%) como un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 328.1.

Paso 3:

15



20

Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3-metil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-4-amina (14.0 g, 42.79 mmol, 1.0 equivalente), morfolina (14.91 ml, 171.19 mmol, 4.0 equivalentes) y trietilamina (23.89 ml, 171.19 mmol, 4.0 equivalentes) en acetonitrilo (200 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 16 horas a 80°C y se determinó la finalización de

25

la reacción por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se repartió entre agua (100 ml) y acetato de etilo (300 ml). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml).

5 La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto crudo que se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano como sistema solvente) para proporcionar N-(4,4-

10 difluorociclohexil)-2-(3-metil-1H-pirazol-1-il)-6-morfolinopirimidin-4-amina (1) (12.8 g, 33.84 mmol, 79% de rendimiento) como un sólido blanquecino.

Datos analíticos:

MS (MH⁺): m/z=379.2; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-D₆): δ

15 8.41 (d, *J* = 2 Hz, 1H), 7.07 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.25 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 3.9 (bs, 1H), 3.67 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 3.49 (s, 4H), 2.23 (s, 3 H), 2.23-1.97 (m, 3H), 1.92-1.90 (m, 3H), 1.55-1.53 (m, 2H).

¹H NMR mostró, a través de la integración, 3

20 resonancias de protones en la región aromática y 1 resonancia amplia correspondiente al protón intercambiable en N-18. Los protones aromáticos se observaron como dos dobletes y un singlete, que indica dos protones adyacentes y un protón aromático aislado. En la región alifática, se

25 observaron resonancias correspondientes a 20 protones, mostrando 1 singlete distinto. La integración de estas resonancias correspondió a dos resonancias de doblete-

doblete de dos campos elevados, una con un protón de multipletes parcialmente superpuestos, y cuatro de multipletes de campo inferior, dos de los cuales se superponen parcialmente. Los multipletes alifáticos de campo elevado están asociados con el radical de morfolina de la estructura. Los multipletes de campo inferior se dividen adicionalmente por la proximidad de CF_2 a estos protones. En el análisis de LC/MS de alta resolución (HR), se observó el ion pseudomolecular ($\text{M}+\text{H}^+$) a bajo voltaje del fragmentador (70V) en el modo de ion positivo ESI en m/z 379.20580. El otro ion prominente observado en m/z 779.38575 es atribuible al aducto de dímero en la fuente $2\text{M} + \text{Na}^+$.

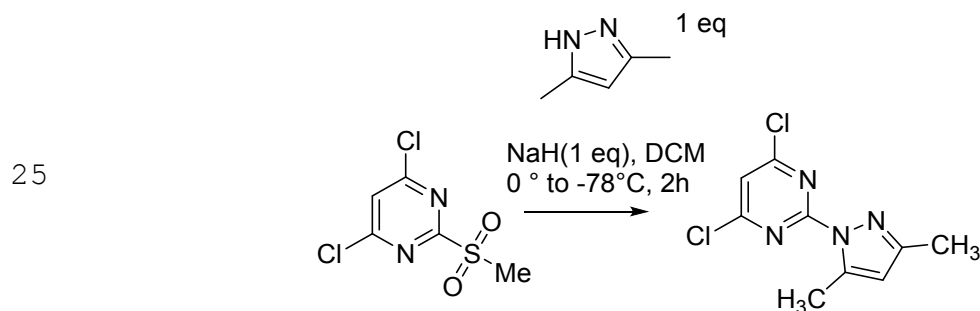
Los datos de ^{13}C NMR revelaron 14 resonancias de carbono separadas y se generaron a partir de un espectro de carbono ^{13}C desacoplado adquirido a 25°C en CDCl_3 . Las 14 resonancias son consistentes con la estructura de 1 en la cual cuatro pares de los 18 carbonos son espectroscópicamente equivalentes. Se observó que una resonancia de carbono (C-12 a 77.05 ppm) estaba parcialmente oculta por la resonancia de CHCl_3 en el espectro. La presencia de un carbono en esta resonancia se confirmó mediante la recolección de un espectro de ^{13}C en C_6D_6 ; se observó una resonancia a 79.7 ppm sin interferencia del pico de solvente, además de todas las otras resonancias observadas. Se observa un triplete ($2J = 244 \text{ Hz}$) en la resonancia C-22 de 122.29, se observan dos tripletes

adicionales a 31.53 ppm (C-21 y C-23, $3J = 24.93$ Hz), y a 31.53 ppm (C-20 & C-24, $4J = 5.37$ Hz). Cada uno de los triplete observados es consistente con la sustitución de F2 en C-22 y la constante de acoplamiento decreciente con respecto al flúor a medida que aumenta el número de enlaces intermedios.

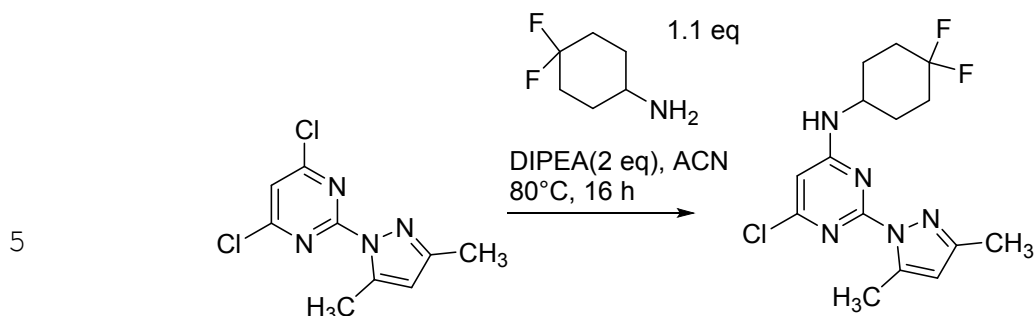
La conectividad carbono-protón y la conectividad carbono-carbono (a través de las correlaciones C-C-H de 2 y 3 enlaces) del marco molecular se confirmaron mediante la colección de espectros de 2D NMR. La conectividad C-H directa se confirmó mediante HSQC, y la conectividad de 2 y 3 enlaces se demostró mediante HMBC. Las correlaciones cruzadas de corto y largo plazo (más de 2 o 3 enlaces) son consistentes con las conexiones esperadas de la estructura propuesta. Finalmente, los datos de cambios químicos observados asignados como se muestra arriba fueron consistentes con los cambios químicos predichos por computadora ^1H y ^{13}C para la estructura propuesta.

N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)-6-metoxipirimidin-4-amina

Paso 1:



Un matraz de fondo redondo, secado al fuego, de cuatro cuellos de 5000 ml, equipado con una cuchilla de agitación recubierta de teflón (5 cm) unida con una varilla de vidrio (cuello 1), tapón (cuello 2) y embudo de adición con tapón (cuello 3) y un adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 4), se cargó con una suspensión de hidruro de sodio (35.2 g, 880 mmol, 1 equivalente) en diclorometano (1000 ml) se añadió 3,5-dimetilpirazol (84.6 g, 880 mmol, 1 equivalente) a 0°C y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 30 minutos, se añadió gota a gota 4,6-dicloro-2-(metilsulfonil)pirimidina (200 g, 880 mmol, 1 equivalente) (disuelto en diclorometano (1000 ml) a través de un embudo de goteo a la mezcla de reacción a -78°C. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura y la finalización de la reacción se determinó por TLC y UPLC. Después de 2 h, la mezcla de reacción se templó con agua a -78°C y se diluyó con diclorometano. Después de 5 minutos, se decantó el diclorometano y se lavó con solución salina. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto crudo, que se purificó por cromatografía en columna usando acetato de etilo y pet-éter como un ssolvente para proporcionar 4,6-dicloro-2-(3,5-dimetil-1h-pirazol-1-il)pirimidina (138 g, 567.71 mmol, 65%) como un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 244.2.

Paso 2:

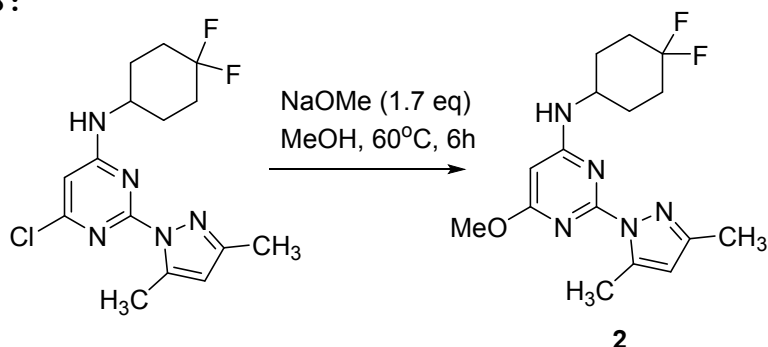
Un matraz de fondo redondo secado al fuego, de tres cuellos de 2000 ml, equipado con una barra de agitación recubierta de teflón (5 cm), un septo (cuello 1), un tapón (cuello 3) y un condensador de reflujo equipado con un adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 2), se cargó con una solución de 4,6-dicloro-2-(3,5-dimetil-1h-pirazol-1-il)pirimidina (136 g, 559.4 mmol, 1 equivalente) en acetonitrilo (1500 ml) seguido de clorhidrato de 4,4-difluorociclohexilamina (105.6 g, 615.4 mmol, 1.1 equivalente) y N,N-diisopropil etilamina (194.88 ml, 1118.8 mmol, 2 equivalentes). La mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 16 h. La finalización de la reacción se determinó por TLC y UPLC. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se trituroó con agua (500 ml). El sólido resultante se filtró, se lavó con pet-éter, se secó bajo vacío para proporcionar 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3,5-dimetil-1h-pirazol-1-il)pirimidin-4-amina (191 g, 556 mmol, > 95%) como un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 342.0.

10

15

20

25

Paso 3:

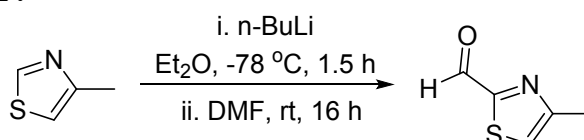
Un matraz de fondo redondo, secado al fuego, de tres cuellos de 250 ml, equipado con una barra de agitación recubierta de teflón (2 cm), un septo (cuello 1), un tapón (cuello 3) y un condensador de reflujo equipado con un adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 2), se cargó con una solución de 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3,5-dimetil-1h-pirazol-1-il)pirimidin-4-amina (20 g, 58.51 mmol, 1 equivalente) en metanol seguido de metóxido de sodio (21% en metanol, 5.37 g, 99.47 mmol, 1.7 equivalentes). La reacción se calentó a 60°C y la finalización de la reacción se determinó mediante TLC y UPLC. Después de 5 h, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo se diluyó con acetato de etilo, se lavó con agua y se lavó con solución salina. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar el producto crudo que se purificó por cromatografía en columna usando acetato de etilo en petróleo como sistema solvente para proporcionar N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(3,5-dimetil-1H-pirazol-1-il)-6-metoxipirimidin-4-amina (**2**) [16 g (11 g (11% de pureza) + 5

g (92% de pureza), 47.41 mmol, ~80%) como un sólido blanco.
 MS (MH⁺): m/z = 338.1. Datos analíticos: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.45 (bs, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.01 (bs, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.11-
 5 1.82 (m, 6H), 1.60-1.55 (m, 2H).

N-(4,4-difluorociclohexil)-6-metoxi-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina

10

Paso 1:

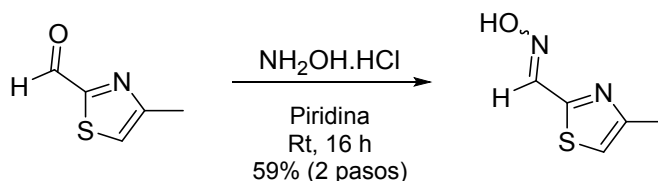


Un matraz de fondo redondo de tres cuellos equipado
 15 con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con dietil éter (250 ml) y se transfirió n-BuLi (241.98 ml, 604.96 mmol, 2.5 M en hexano) a -78°C. Se añadió una solución de 4-metiltiazol (50.0 g, 504.13 mmol) en dietil éter (200 ml) durante un período de 30 minutos. La mezcla
 20 de reacción se convirtió en una suspensión de color amarillo pálido. Después de 1.5 horas, se añadió DMF (58.54 ml, 756.20 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la finalización de la reacción, la mezcla se
 25 vertió en HCl frío (400 ml, 4N) bajo agitación y se separaron las dos capas. La capa orgánica se lavó con HCl frío (2 x 80 ml, 4N)). Las capas combinadas acuosas se

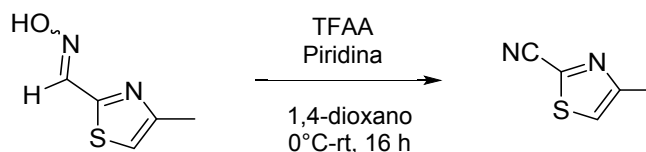
basificaron lentamente con K_2CO_3 (pH 7) y se extrajeron con dietil éter (3 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron a sequedad a temperatura ambiente al vacío para proporcionar 4-
 5 metiltiazol-2-carbaldehído (60.0 g, crudo) como un líquido amarillo pálido. Este material crudo se usó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Paso 2:

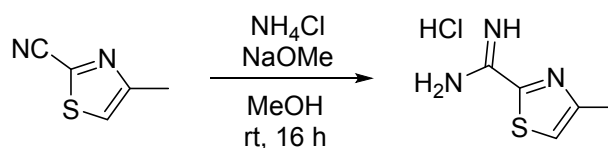
10



Un matraz de fondo redondo de dos cuellos
 15 equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con 4-metiltiazol-2-carbaldehído (60.0 g, crudo) en piridina (38.04 ml, 472.40 mmol). Se añadió clorhidrato de hidroxilamina (32.82 g, 472.40 mmol) en porciones durante un período de 15 minutos. La mezcla de reacción se
 20 agitó a temperatura ambiente durante 16 h en atmósfera de nitrógeno. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la finalización de la reacción, la mezcla se vertió en agua enfriada con hielo y se agitó durante 20 minutos, el sólido obtenido se filtró y se secó bajo vacío
 25 para proporcionar 4-metiltiazol-2-carbaldehído oxima (40.0 g, 281.69 mmol, 59% para dos pasos) como un sólido de color blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 143.0.

Paso 3:

5 Un matraz de fondo redondo de dos cuellos
 equipado con una barra de agitación recubierta de teflón se
 cargó con una solución de 4-metiltiazol-2-carbaldehído
 oxima (35.0 g, 246.44 mmol) y piridina (87.33 ml, 1084.35
 mmol) en 1,4-dioxano (140 ml). Se añadió lentamente
 10 anhídrido trifluoroacético (51.38 ml, 369.66 mmol) a -10°C
 y se dejó agitar a temperatura ambiente durante 16 h. El
 progreso de la reacción se controló por TLC. Después de la
 finalización de la reacción, la mezcla se diluyó con agua
 (250 ml) y se extrajo con dietil éter (3 x 350 ml). Las
 15 capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 250
 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y
 se concentró bajo presión reducida para proporcionar 4-
 metiltiazol-2-carbonitrilo (35.0 g, crudo) como un líquido
 marrón claro. Este material crudo se usó en el siguiente
 20 paso sin purificación adicional. Datos analíticos: ¹H-NMR
 (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.90 (s, 1H), 2.51 (s, 3H).

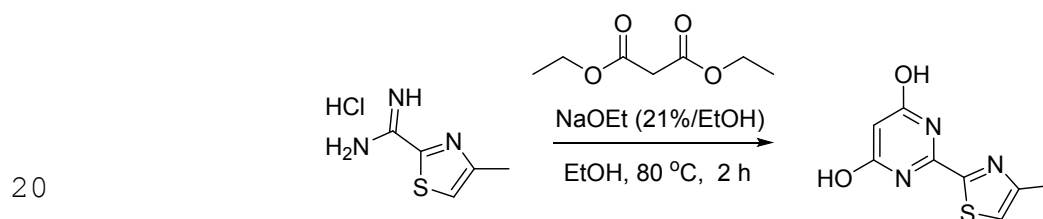
Paso 4:

25

Un matraz de fondo redondo de dos cuellos

equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con 4-metiltiazol-2-carbonitrilo (35.0 g, crudo) en metanol (280 ml) y metóxido de sodio (16.77 g, 310.45 mmol) se añadió. Después de agitar a temperatura ambiente
 5 durante 3 h, se añadió cloruro de amonio (30.19 g, 564.66 mmol) y se agitó durante otras 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. Después de la finalización de la reacción, la mezcla se filtró y se lavó con metanol. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo
 10 se trituró con dietil éter (150 ml). El sólido formado se filtró y se secó a vacío para proporcionar clorhidrato de 4-metiltiazol-2-carboximidamida (35.0 g, crudo) como un sólido blanquecino. Este material crudo se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. MS (MH⁺): m/z =
 15 142.0.

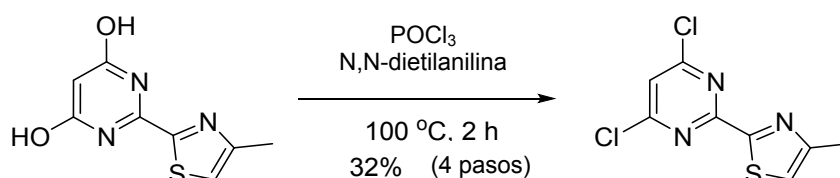
Paso 5:



Un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con clorhidrato de 4-metiltiazol-2-carboximidamida
 25 (35.0 g, crudo) en etanol (350 ml) y malonato de dietilo (150.81 ml, 988.64 mmol). Se añadió gota a gota etóxido de sodio (320 ml, 988.64 mmol, 21% en EtOH) a temperatura

ambiente y se calentó a 85°C. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. Se añadió agua (20 ml) y se acidificó con HCl 1.5 N (pH 2-3). El sólido obtenido se filtró y se secó a vacío para proporcionar 2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidina-4,6-diol (29.0 g, crudo) como un sólido amarillo pálido. Este material crudo se usó en el siguiente paso sin purificación adicional. MS (MH⁺): m/z = 210.0.

10

Paso 6:

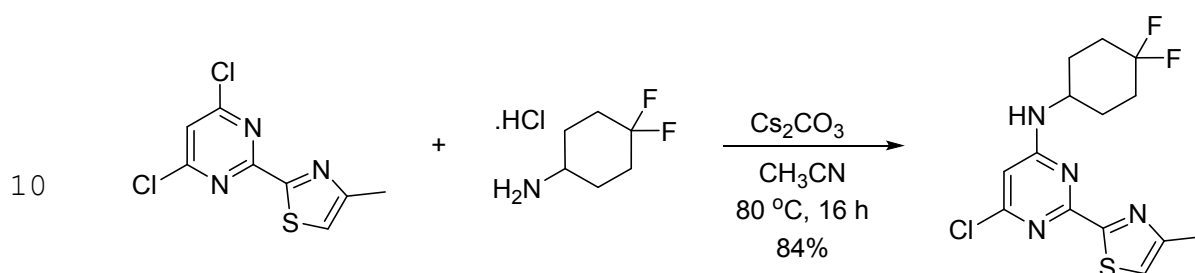
15

Un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con una suspensión de 2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidina-4,6-diol (29,0 g, crudo) y POCl₃ (290 ml). Se añadió N,N-diethylanilina (37.84 ml, 235.85 mmol) a temperatura ambiente y se calentó a reflujo a 100°C durante 2 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. El exceso de POCl₃ se eliminó por destilación. El residuo se diluyó con 500 ml de agua fría, se neutralizó con una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con dietil éter (2 x 500 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (3 x 200 ml) y salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo

25

presión reducida. El residuo se trituró con n-pentano (100 ml). El sólido obtenido se filtró y se secó a vacío para proporcionar 2-(4,6-dicloropirimidin-2-il)-4-metiltiazol 7 (19.5 g, 79.59 mmol, 32% para cuatro pasos) como un sólido
 5 amarillo pálido. MS (MH⁺): m/z = 245.9.

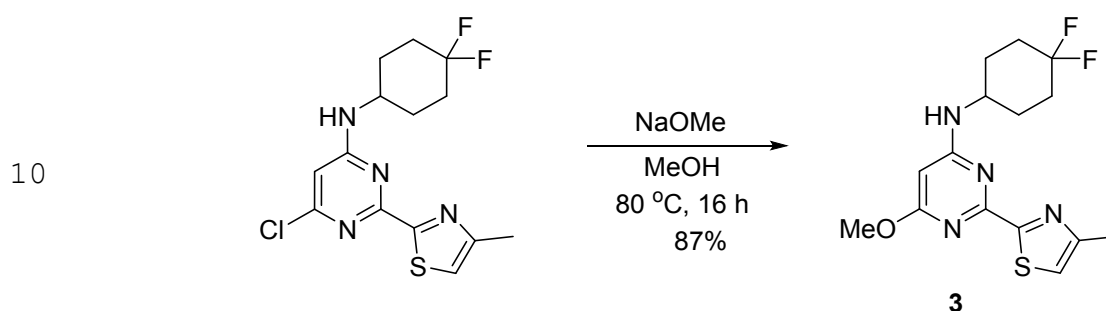
Paso 7:



Un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con una suspensión de 2-(4,6-dicloropirimidin-2-il)-4-metiltiazol (19.0 g, 77.56 mmol) y clorhidrato de 4,4-difluorociclohexan-1-amina (13.30 g, 77.56 mmol) en acetonitrilo (190 ml). Se añadió carbonato de cesio (37.89 g, 116.34 mmol) y la mezcla de reacción se calentó a 80°C
 15 durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el sólido se lavó con acetato de etilo (500 ml). El filtrado se lavó con agua (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de sodio y se
 20 concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60-120) eluido con 15% de EtOAc en hexano. Las fracciones relevantes que

contenían el compuesto requerido se combinaron y se evaporaron a sequedad bajo presión reducida para proporcionar 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina (22.5 g, 65.25 mmol, 84%) como un sólido de espuma blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 344.9.

Paso 8:

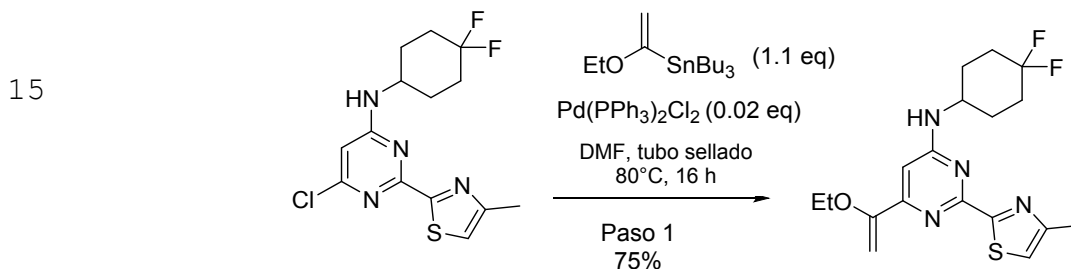


Un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con una barra de agitación recubierta de teflón se cargó con 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina (27.0 g, 78.47 mmol) en metanol (450 ml). Se añadió metóxido de sodio (21.19 g, 392.36 mmol) y se calentó a 80°C durante 16 h. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC. El exceso de metanol se eliminó a presión reducida y el residuo se diluyó con una solución acuosa al 10% de cloruro de amonio (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 150 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (gel de sílice 60-120) eluyendo con 35-40% de EtOAc en hexano. Las fracciones

relevantes que contienen el compuesto objetivo se combinaron y se evaporaron a sequedad bajo presión reducida para proporcionar N-(4,4-difluorociclohexil)-6-metoxi-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina (3) (23.4 g, 68.82 mmol, 87%) como un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z=341.0. Datos analíticos: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.41 (s, 1 H), 7.40 (s, 1 H), 5.81 (s, 1 H), 3.87 (s, 3 H), 2.43 (s, 3 H), 2.08-1.89 (m, 6 H), 1.61-1.52 (m, 2 H).

(S)-1-(6-((4,4-difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-il)etan-1-ol

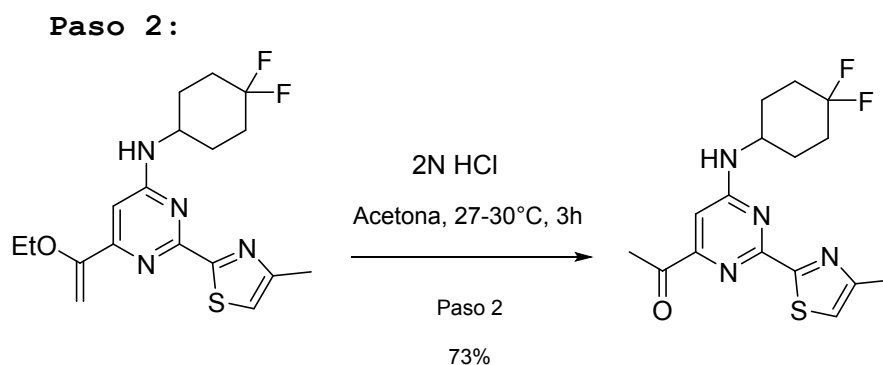
Paso 1:



Un tubo sellado de 250 ml, equipado con una barra de agitación recubierta de teflón (2 cm), se cargó con una solución de 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina (4.9 g, 14.24 mmol, 1.0 equivalentes) y tributil(1-etoxivinil)estannano (5.65 g, 15.66 mmol, 1.1 equivalentes) en N,N-dimetilformamida (60 ml). La mezcla de reacción se desgasificó utilizando gas argón durante 5-10 minutos, seguido de la adición de dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (0.2 g, 0.28

mmol, 0.02 equivalentes). La mezcla de reacción se selló y se calentó a 80°C durante 16 h (la finalización de la reacción se determinó mediante LCMS) y se enfrió a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con
 5 agua (300 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron para proporcionar un producto crudo en forma de un sólido pegajoso de color marrón claro. El material crudo se
 10 purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo/hexano como sistema solvente) para proporcionar N-(4,4-difluorociclohexil)-6-(1-etoxivinil)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-amina (4.1 g, 10.78 mmol, 75%) como un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 381.0.

15

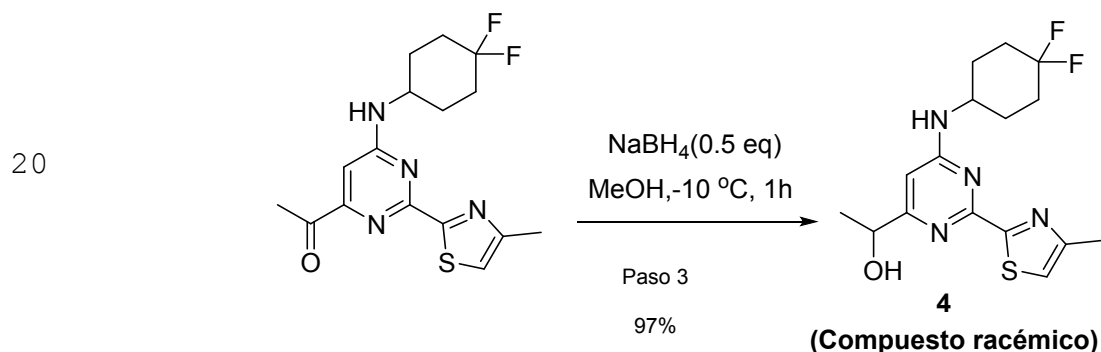


20

Un matraz de fondo redondo equipado con una barra de agitación recubierta con teflón se cargó con N-(4,4-difluorociclohexil)-6-(1-etoxivinil)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidina-4-amina (9.0 g, 23.67 mmol, 1.0 equivalente)
 25 en acetona (120 ml) seguido de la adición de una solución acuosa de ácido clorhídrico 2N (20 ml). La mezcla de

reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas y
 la finalización de la reacción se determinó mediante LCMS.
 La mezcla de reacción se concentró para eliminar la
 acetona, se diluyó con agua enfriada con hielo (100 ml), se
 5 basificó con solución saturada de sodio por carbonato y se
 extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Los extractos
 orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se
 filtraron y se evaporaron bajo presión reducida para
 proporcionar un producto crudo en forma de un sólido
 10 pegajoso de color marrón claro. El material crudo se
 purificó por cromatografía en columna (acetato de
 etilo/hexano como sistema solvente) para proporcionar 1-(6-
 ((4,4-difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-
 il)pirimidin-4-il)etan-1-ona (6.1 g, 17.32 mmol, 73%) como
 15 un sólido blanquecino. MS (MH⁺): m/z = 353.0.

Paso 3:



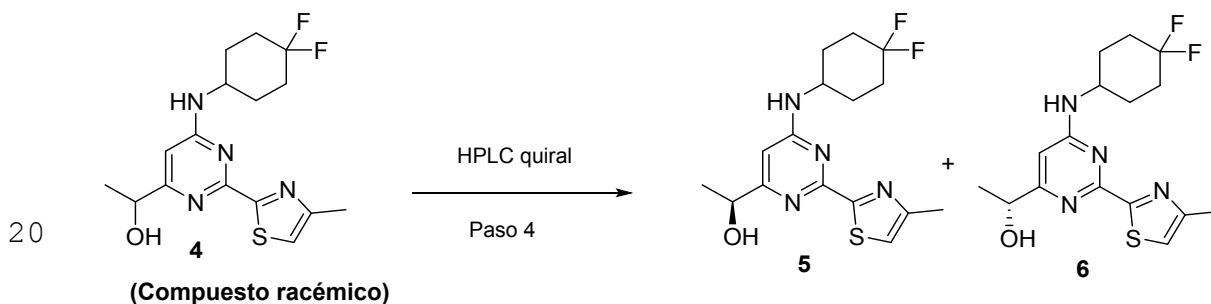
Un matraz de fondo redondo equipado con una barra
 25 de agitación recubierta con teflón se cargó con 1-(6-((4,4-
 difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-
 4-il)etan-1-ona (5.6 g, 15.90 mmol, 1.0 equivalente) en

metanol (80 ml) a -10°C seguido de borohidruro de sodio (0.302 g, 7.95 mmol, 0.5 equivalentes). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura durante 1 hora y la finalización de la reacción se determinó mediante LCMS.

5 La mezcla de reacción se templó con agua y se concentró bajo presión reducida para eliminar el metanol. El residuo se diluyó con agua enfriada con hielo (100 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron

10 y se evaporaron bajo presión reducida para proporcionar 1-(6-((4,4-difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-4-il)etan-1-ol 4 (5.5 g, 15.53 mmol, 97%) como un sólido blanquecino de mezcla racémica. MS (MH⁺): m/z = 355.0.

15

Paso 4:

El compuesto racémico 1-(6-((4,4-difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-

25 4-il)etan-1-ol 4 (5.5 g) se purificó por HPLC quiral (Columna: Chiralpak-IC (250*20*5.0 μ); Fase móvil A: N-hexano (0.1% DEA), Fase móvil B: IPA: DCM (90:10)

isocrática: 50:50 (A: B); Caudal: 15.0 ml/min; 120/inj;
 Tiempo de ejecución: 15 minutos) para proporcionar (S)-1-
 (6-((4,4-difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-
 il)pirimidin-4-il)etan-1-ol 5 (2.1 g, 5.93 mmol, 38%) como
 5 un sólido blanquecino de las primeras fracciones de elución
 (Pico-1, RT = 4.24 minutos). MS (MH⁺): m/z=355.0. ¹H NMR
 (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.59-7.57 (d, J = 6.0 Hz, 1H),
 7.37(s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.37-5.36 (d, J = 4.4 Hz, 1H),
 4.52-4.50 (t, J = 11.2 Hz, 5.6 Hz, 1H), 4.05 (bs, 1H), 2.43
 10 (s, 3H), 2.10-1.96 (m, 6H), 1.62-1.59 (m, 2H), 1.35-1.33
 (d, J = 6.4 Hz, 3H). Otro enantiómero: (R)-1-(6-((4,4-
 difluorociclohexil)amino)-2-(4-metiltiazol-2-il)pirimidin-
 4-il)etan-1-ol 6 (2.05 g, 5.78 mmol, 37%) como un sólido
 blanquecino de las segundas fracciones de elución (Pico-2,
 15 RT = 6.45 min.). MS (MH⁺): m/z=355.0. ¹H NMR (400 MHz,
 DMSO-d₆): δ 7.60-7.59 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.37(s, 1H),
 6.64 (s, 1H), 5.38 (bs, 1H), 4.52-4.51 (d, J = 6.8 Hz,
 1H), 4.10 (bs, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.10-1.91 (m, 6H), 1.65-
 1.57 (m, 2H), 1.35-1.34 (d, J = 6.8 Hz, 3H).

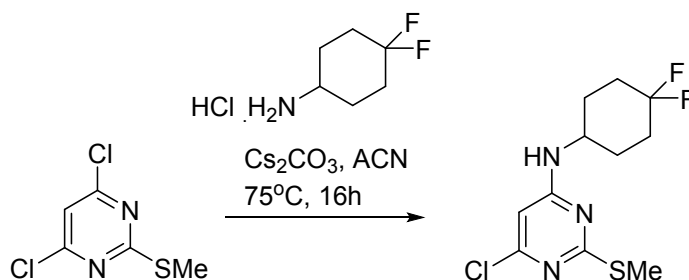
20

**2-(3-ciclopropil-1H-pirazol-1-il)-N-(4,4-
 difluorociclohexil)-6-morfolinopirimidin-4-amina**

25

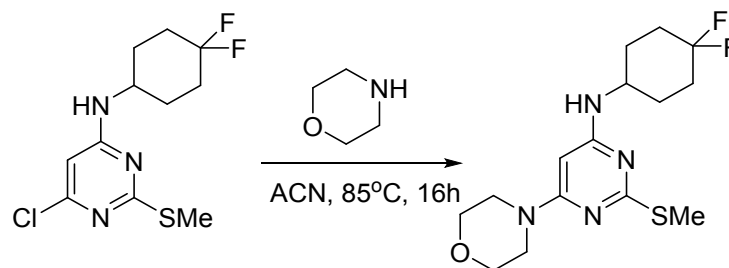
Paso 1:

5



Un matraz de fondo redondo, secado al fuego, de tres cuellos de 1000 ml, equipado con una barra de agitación recubierta de teflón (3 cm), un septo (cuello 1), un tapón (cuello 3) y un condensador de reflujo equipado con adaptador de tubo en U de salida-entrada de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 2), se cargó con una solución de 4,6-dicloro-2-(metiltio)pirimidina (150 g, 768.94 mmol, 1.0 equivalente) en acetonitrilo (1500 ml) seguido de clorhidrato de 4,4-difluorociclohexilamina (158.35 g, 922.733 mmol) y carbonato de cesio (526 g, 1614 mmol, 2.1 equivalentes). La mezcla de reacción se calentó a 75°C durante 16 h. La mezcla de reacción se filtró para eliminar el carbonato de cesio, luego el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar 210 g (rendimiento del 93%) de 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina como un sólido amarillo pálido. MS (MH⁺): m/z = 294.0.

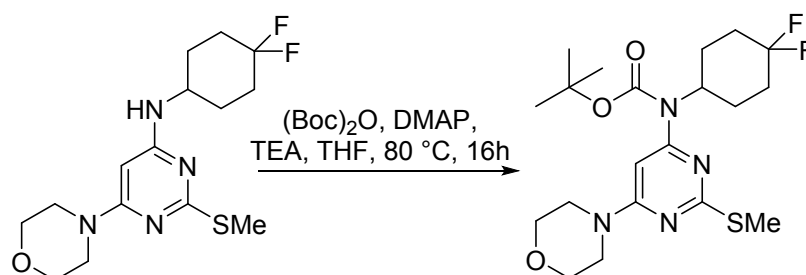
25

Paso 2:

5

Una solución de 6-cloro-N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(metiltio)pirimidin-4-amina (60 g, 204.24 mmol, 1.0 equivalente) y morfolina (35.6 ml, 408.48 mmol, 2.0 equivalentes) en acetonitrilo (600 ml) se calentó a 85°C en un tubo sellado durante 16 h. Una vez finalizada la reacción, la mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se templó con agua enfriada con hielo. El sólido obtenido se filtró y se lavó con agua (500 ml), hexano (250 ml), se secó a alto vacío para proporcionar N-(4,4-difluorociclohexil)-2-(metiltio)-6-morfolinopirimidin-4-amina como un sólido blanquecino (62 g, 88% de rendimiento). MS (MH⁺): m/z = 345.2.

20

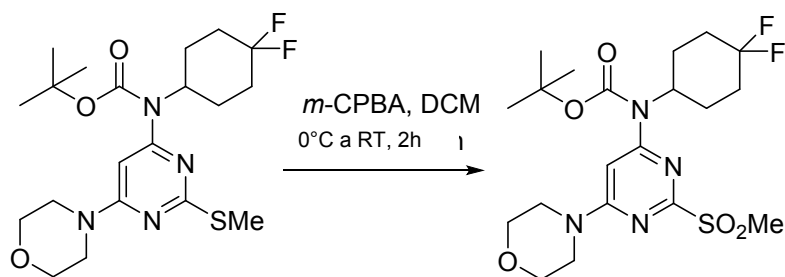
Paso 3:

25

Un matraz de fondo redondo, secado al fuego, de tres cuellos, equipado con una barra de agitación

recubierta de teflón (3 cm), un septo (cuello 1), tapón (cuello 3) y un condensador de reflujo equipado con adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 2), se cargó con una solución de N-
 5 (4,4-difluorociclohexil)-2-(metiltio)-6-morfolino pirimidin-4-amina (1 g, 2.90 mmol) en tetrahidrofurano (15 ml) seguido de 4-N,N-dimetilaminopiridina (0.1 g, 0.87 mmol, 0.3 equivalentes), trietilamina (1.2 ml, 8.71 mmol, 3.0 equivalentes) y anhídrido de Boc (3.16 g, 14.51 mmol, 10 5.0 equivalentes), luego la mezcla de reacción se calentó a 80°C durante 16 h. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se templó con agua y se extrajo con acetato de etilo (2 x 75 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se
 15 concentró para proporcionar carbamato de terc-butil (4,4-difluorociclohexil) (2-(metiltio)-6-morfolino pirimidin-4-il)carbamato como una goma amarilla (1.1 g, 85 %). MS (MH⁺): m/z = 445.2.

20

Paso 4:

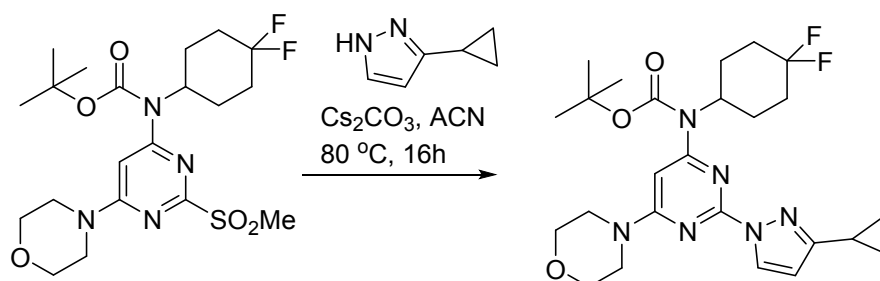
25

Un matraz de fondo redondo de un solo cuello de 100 ml, conectado con un condensador de reflujo equipado

con un adaptador de tubo en U de salida-entrada de gas nitrógeno lleno de aceite, una barra de agitación recubierta de teflón (1 cm), se cargó con una solución de terc-butyl (4,4-difluorociclohexil) (2-(metiltio)-6-
 5 morfolinopirimidin-4-il)carbamato (50 g, 112.47 mmol) en diclorometano (600 ml) seguido de ácido 3-cloroperbenzoico (ácido m-cloroperbenzoico) (58.2 g, 337.42 mmol, 3.0 equivalentes) a 0°C. La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante 30
 10 minutos. Después de la finalización de la reacción, la mezcla de reacción se templó con una solución saturada de bicarbonato y se extrajo con diclorometano (2x250 ml). La capa orgánica combinada se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró para proporcionar terc-butyl (4,4-
 15 difluorociclohexil) (2-(metilsulfonil)-6-morfolinopirimidin-4-il)carbamato como una goma blanquecina (52 g, rendimiento del 97%). MS (MH⁺): m/z = 477.3.

Paso 5:

20



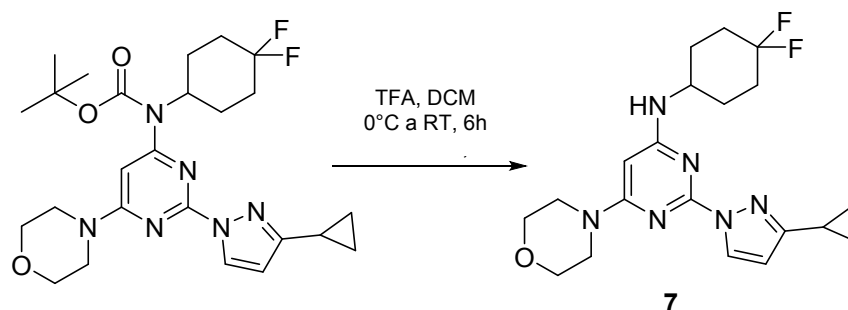
25

Un matraz de fondo redondo de un solo cuello de 100 ml, conectado con un condensador de reflujo equipado con un adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas

nitrógeno lleno de aceite, una barra de agitación
 recubierta de teflón (2 cm), se cargó con una solución de
 terc-butil (4,4-difluorociclohexil) (2-(metilsulfonil)-6-
 morfolinopirimidin-4-il)carbamato (0.9 g, 1.88 mmol) en
 5 acetonitrilo (10 ml) seguido de 3-ciclopropil-1H-pirazol
 (0.3 g, 2.83 mmol, 1.5 equivalentes) y carbonato de cesio
 (1.23 g, 3.77 mmol, 2.0 equivalentes). La mezcla de
 reacción se calentó a 80°C durante 16 horas, y la
 finalización de la reacción se determinó mediante TLC y
 10 LCMS. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se
 concentró. El producto crudo se purificó mediante
 cromatografía en columna usando 60-120 gel de sílice con
 acetato de etilo-pet éter como sistema solvente. El
 material aislado se secó al vacío para obtener terc-butilo
 15 (2-(3-ciclopropil-1H-pirazol-1-il)-6-morfolinopirimidin-4-
 il) (4,4-difluorociclohexil)carbamato como un sólido
 blanquecino (0.8 g, 84%). MS (MH⁺): m/z = 505.

Paso 6:

20



25

Un matraz de fondo redondo, secado al fuego, de
 tres cuellos, de 100 ml equipado con una barra de agitación
 recubierta de teflón (2 cm), un septo (cuellos 1), tapón

(cuello 3) y un adaptador de tubo en U de entrada-salida de gas nitrógeno lleno de aceite (cuello 2), se cargó con una solución de terc-butilo (2-(3-ciclopropil-1H-pirazol-1-il)-6-morfolinopirimidin-4-il)(4,4-difluorociclohexil)carbamato (1.2 g, 1.98 mmol, 1 equivalente) en diclorometano (40 ml) seguido de ácido trifluoroacético (2.5 ml, 32.55 mmol, 16.4 equivalentes) a 0°C. La mezcla de reacción se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó a la misma temperatura durante 6 horas. La finalización de la reacción se determinó por TLC y UPLC. La mezcla de reacción se concentró y el residuo resultante se templó con una solución saturada de bicarbonato de sodio al 10%, se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml) y se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto crudo. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna utilizando 60-120 gel de sílice, acetato de etilo-pet-éter como un sistema solvente. El sólido resultante se secó al vacío para proporcionar 2-(3-ciclopropil-1H-pirazol-1-il)-N-(4,4-difluorociclohexil)-6-morfolinopirimidin-4-amina 7 (0.73 g, 90%). MS (MH⁺): m/z=405. Datos analíticos: ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.39 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.14 (d, J = 2.80 Hz, 1H), 5.53 (s, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.69-3.67 (m, 4H), 3.50 (m, 4H), 1.99-1.90 (m, 7H), 1.56-1.54 (m, 2H), 0.93-0.89 (m, 2H), 0.72-0.71 (m, 2H).

Ensayos biológicos

La actividad biológica se determinó como sigue. La corriente iónica a través de canales de K^+ activados por Ca^{2+} de conductancia pequeña (canales de SK, subtipo 2) se midió utilizando la configuración de célula completa de la técnica de pinzamiento de parche en una configuración de pinzamiento de parche utilizando canales de SK2 que expresan células de cultivo de tejidos HEK293 como se describe en Hougaard et al., British Journal of Pharmacology 151,655-665, 8 de mayo de 2007, cuyas enseñanzas completas se incorporan aquí como referencia. En un aspecto, un compuesto se define como un modulador alostérico de SK positivo (PAM) si el compuesto aumenta la corriente en este ensayo, por ejemplo, si el valor SC_{100} del compuesto es menor o igual a 10 μM como se determina en este ensayo. El valor SC_{100} se define como la concentración de compuesto que aumenta la corriente basal en un 100%.

El valor SC_{100} se da en el cuadro 1.

Se administraron ratas Sprague Dawley macho con ya sea el vehículo, 10, o 30 mg/Kg del compuesto 1 por administración oral 30 minutos antes de la inyección de harmalina para investigar el efecto terapéutico del Compuesto 1 sobre el temblor inducido por harmalina. Inmediatamente después de la inyección de harmalina, los animales se colocaron en el aparato de cuantificación del temblor y los eventos del temblor se cuantificaron durante 60 minutos. Se generó una señal de evento de temblor cuando

una pequeña banda transmisora de metal ajustada a la pata delantera derecha del animal se movió dentro del campo electromagnético generado por una antena de bucle dentro del aparato de prueba. Las salidas del amplificador se digitalizaron a una frecuencia de muestreo de 1,000 Hz y la señal se procesó y analizó con el software LabView (National Instruments). Para minimizar la señal del comportamiento ambulatorio y de aseo, la señal se filtró con un filtro de promedio móvil no ponderado de 128 ms, y los eventos con amplitudes > 0.5 V y duración de > 300 ms de duración se contaron como un evento de temblor. Los datos se analizaron en intervalos de un minuto a lo largo del curso de la prueba y se presentaron como la suma de los eventos de temblor en toda la prueba de 60 minutos. Como se muestra en la figura 1, se observó una inhibición significativa de los temblores a una dosis de 30 mg/kg del compuesto 1.

La reducción del temblor con el Compuesto 1 también se ha demostrado mediante la medición de la frecuencia del temblor de todo el cuerpo a través de un acelerómetro de placa de fuerza.

El temblor de todo el cuerpo se midió con un monitor de temblor de San Diego Instruments (San Diego, California, USA). Los animales se trataron previamente con 3, 10 o 30 mg/kg del compuesto 1 por vía oral 30 minutos antes de la administración intraperitoneal de 5 mg/kg de harmalina. El temblor se midió durante 30 minutos después

de la administración de harmalina, y los datos se analizaron mediante la transformada rápida de Fourier y se informaron como un espectro de potencia de frecuencia. Harmalina indujo un aumento significativo en el espectro de potencia en una banda de frecuencias entre 10 y 14 Hz. En este intervalo, 3, 10 y 30 mg/kg redujeron significativamente el temblor. Los datos se analizaron adicionalmente calculando el porcentaje de potencia de movimiento (% MP), definido como la potencia en la banda de 9-13 Hz dividida por la potencia total en todo el espectro (0-30 Hz) multiplicada por 100. Según este análisis, 3, 10, y 30 mg/kg redujeron significativamente el temblor inducido por harmalina (harmalina + vehículo (n = 13); harmalina + 3 mg/kg Compuesto 1 (n = 8), $P < 0.01$; 10 mg/kg del Compuesto 1 (n = 16) y 30 mg/kg del Compuesto 1 (n = 13), respectivamente, $P < 0.05$) (Figura 2).

Tomados en conjunto, estos datos muestran que el Compuesto 1 reduce significativamente el temblor inducido por harmalina medido por dos diseños experimentales diferentes.

El grado en que los compuestos modulan los canales de SK2 *in vivo* se expresa como % SK2 SC₁₀₀, que es la relación entre la concentración del fármaco libre en el cerebro a la potencia medida del compuesto en el canal de SK2. Se calcula de la siguiente manera: $C_{FB} = C_{MB} \times BFF$, donde C_{MB} es la concentración del compuesto medida por espectrometría de masas de cromatografía líquida de

cerebros recolectados inmediatamente después del registro del temblor (Cuadro 1, "Concentración cerebral medida"). C_{FB} es la cantidad de compuesto libre no forma complejos con proteínas y, por lo tanto, libre para interactuar con el canal de SK2 (Cuadro 1, "Concentración cerebral libre calculada"). BFF es la fracción media libre de compuesto medida por diálisis de equilibrio en experimentos separados (concentración de prueba 1 μ M incubada en homogeneizado de tejido cerebral de rata al 10% durante 5 horas a 37°C) (Cuadro 1, "Fracción libre de cerebro"). El fármaco libre en el cerebro disponible para interactuar con los canales de SK2 (C_{FB}) se obtiene al multiplicar el nivel cerebral total medido (C_{MB}) por la fracción libre promedio (BFF).

La cantidad de compuesto libre se expresa luego en términos de su potencia contra el canal de SK2 de la siguiente manera: $\% \text{ SK2 SC}_{100} = C_{FB} / \text{SK2 SC}_{100} \times 100$, donde SK2 SC_{100} (Cuadro 1, "SK2 SC_{100} ") es el valor medido de potencia del compuesto en los canales de SK2 y $\% \text{ SK2 SC}_{100}$ (Cuadro 1, " $\% \text{ SK2 SC}_{100}$ ") es la concentración cerebral libre (C_{FB}) normalizada a SK2 SC_{100} . Los valores se dan en el cuadro 1.

CUADRO 1

Compuesto	Dosis mínimamente eficaz (mg/Kg)	Concentración cerebral medida (μ M)	Fracción libre de cerebro medida	Concentración cerebral libre calculada (μ M)	SK2 SC_{100} medido (μ M)	$\% \text{ SK2 SC}_{100}$ calculado
1	30	1.3	0.065	0.08	0.5	16

Efecto sobre la irregularidad en la activación de
células de Purkinje en cortes ex vivo de ratones
transgénicos SCA2 58Q

En los cortes de cerebelo de ratones SCA2 58Q,
5 las neuronas de Purkinje exhiben un disparo caótico,
medible como un aumento en el coeficiente de variación del
intervalo entre picos (ISI CV), una medida de la
regularidad del intervalo de disparo entre potenciales de
acción. La diferencia en ISI CV entre ratones de tipo
10 silvestre (N = 8) y SCA2 58Q (N= 11) se ilustra en la
figura 3 (p <0.005). También se muestra, la aplicación
secuencial en baño de 1 (N = 11) o 3 μ M (N = 10) del
Compuesto 1 revirtió parcialmente el aumento en ISI CV
observado en cortes de cerebelo de ratones SCA2 58Q de once
15 meses de edad (P <0.05). Estos datos indican que el
Compuesto 1 regulariza el disparo de Purkinje restaurando
parcialmente el intervalo entre picos en este modelo de
ratón de Ataxia espinocerebelosa.

20 Evaluación del efecto del compuesto en el modelo
de ratón inestable de ataxia 2 episódica (EA2)

El Compuesto 1 ha demostrado eficacia en modelos
animales validados de ataxia hereditaria (EA2) y ET
(temblor inducido por harmalina). Para probar si el
25 Compuesto 1 puede aliviar la ataxia en un modelo de
enfermedad, se evaluó en el modelo de ratón EA2
"inestable". Estos ratones muestran una ataxia basal que

surge de una irregularidad en el disparo del marcapasos celular de Purkinje debido a una mutación con pérdida de función en los canales P/Q Ca^{2+} (la misma proteína que está mutada en SCA6), que causa Ataxia Episódica 2 (EA2). Los
5 animales se evaluaron en el aparato de piso de varillas paralelas, que cuenta automáticamente el número de veces que el pie del animal se desliza a través de las varillas de metal espaciadas uniformemente y la distancia total que el animal viaja. La ataxia de línea de base se expresó
10 entonces como la relación de ataxia, que es el número total de deslizamientos del pie dividido por la distancia total que el animal viaja en centímetros. El aumento en la relación de ataxia entre ratones de tipo silvestre y EA2 se ilustra en la figura 4.

15 En este estudio, los ratones EA2 (8-10 meses de edad; $n = 18$) se inyectaron por vía intraperitoneal con el Compuesto 1 o vehículo 30 minutos antes de colocarlos en el aparato de piso de varilla paralelo. Los animales se evaluaron en un diseño de estudio cruzado con cada animal
20 que recibió el vehículo y 10 mg/kg del compuesto 1. Se permitieron tres días entre las dosis para el lavado del compuesto. A la dosis administrada en este estudio, el Compuesto 1 revirtió completamente el aumento en la Relación de Ataxia observado en EA2 frente a los ratones de
25 tipo silvestre. Estos datos indican que el Compuesto 1 restaura el rendimiento normal en esta medida de la función motora en un modelo de ataxia cerebelosa hereditaria.

Ventajas comparativas

Los siguientes estudios ilustran otras ventajas técnicas de los compuestos descritos aquí.

Se realizaron pruebas de solubilidad acuosa (solubilidad cinética) de los compuestos en solución salina tamponada con fosfato (pH 7.4) medida por el método de matraz de agitación. En este ensayo, la solución madre de DMSO del compuesto de prueba se agrega al tampón seguido por el equilibrio (agitación), la filtración y la determinación de la cantidad soluble por HPLC-UV. Las condiciones utilizadas en el ensayo se resumen a continuación. Los resultados se muestran en el cuadro 2 y el cuadro 3.

- Concentración del compuesto: 200µM con DMSO al 1% (n = 2)

- Tampón acuoso: sistema de tampón de fosfato 0.05 M, pH 7.4

- Período de equilibrio: 16 horas a temperatura ambiente (~23°C) con agitación

- Preparación de la muestra: Filtración

- Análisis: HPLC-UV

- Compuestos de referencia: cafeína (alta solubilidad) y dietilestilbestrol (baja solubilidad)

El perfil de estabilidad metabólica de los compuestos se realizó en microsomas hepáticos. En este ensayo, el compuesto de prueba se incubaba con microsomas hepáticos en presencia de NADPH durante 2 puntos de tiempo

a 37°C. Al final de la incubación, la reacción se templea con acetonitrilo que contiene el estándar interno y el compuesto de origen restante se determina por LC-MS/MS. Las condiciones utilizadas en el ensayo se resumen a
5 continuación. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

- Tiempo de incubación: 0 y 30 minutos a pH 7.4, 37°C.

- Concentración de prueba: 1µM en DMSO al 0.02% a pH 7.4 (n = 2)

10 - Concentración de NADPH en el ensayo: 1 mM

- Concentración de proteínas del microsoma hepático en el ensayo: 0.5 mg/ml.

- Análisis: LC-MS/MS

- Datos reportados: % de compuesto de origen
15 restante (% PCR)

- Se incluyen compuestos de referencia para alta y baja depuración.

- Especies probadas: ratón, rata, perro, mono y humano.

20 Los compuestos descritos aquí se analizaron para determinar la inhibición de CYP a través de 5 isoformas (3A4, 2D6, 2C9, 2C19 y 1A2). En este ensayo, los sustratos específicos de isoforma CYP se incuban con microsoma hepático humano (HLM) en presencia de compuestos de prueba,
25 y se determina la formación de metabolitos. Se calcula el porcentaje de inhibición de la formación de metabolitos a diferentes concentraciones del compuesto de prueba y se

determina la IC_{50} . Las condiciones utilizadas en el ensayo se resumen a continuación. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

- Concentración del fármaco de prueba
5 (inhibidor): 8 concentraciones diferentes (100 μ M a 0.005 μ M)
- Matriz: Microsoma hepático humano (Invitrogen, life technologies)
- Se utilizarán sustratos de sonda específicos
10 para las isoformas como se indica a continuación:
 - CYP3A4: Midazolam
 - CYP2D6: Bufuralol
 - CYP2C9: Diclofenaco
 - CYP2C19: Mefenitoína
 - 15 - CYP1A2: Fenacetina
 - Cofactores: NADPH (1mM final en ensayo)
 - Análisis de muestras: LC-MS/MS (metabolitos)
 - Inhibidores de referencia específicos incluidos en todos los ensayos
- 20 (Quetoconazol/Quinidina/Sulfafenazol/Ticlopidina/Furafilina)
- Tampón: tampón de fosfato de potasio (100 mM)
pH 7.4
- 25 - Nivel de DMSO en ensayo: 0.1%.
- Análisis de datos: % de inhibición sobre el control.

Los compuestos se ensayaron en un ensayo de hERG de canal de potasio cardíaco. hERG es responsable de una rápida corriente rectificadora retardada (I_{Kr}) en ventrículos humanos. La inhibición de I_{Kr} es la causa más
5 común de prolongación del potencial de acción cardíaca por parte de fármacos no cardíacos. Véase, por ejemplo, e.g., Brown, A.M. and Rampe, D. (2000). Drug-induced long QT syndrome: is HERG the root of all evil? Pharmaceutical News 7, 15-20.

10 Las células HEK-293 se transfectaron de forma estable con ADNc de hERG. Los transfectantes estables se seleccionaron por coexpresión con el gen de resistencia a G418 incorporado en el plásmido de expresión. La presión de selección se mantuvo incluyendo G418 en el medio de
15 cultivo. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (D MEM/F-12) suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina y 500 μ g/ml de G418. Los registros de cultivo celular se
20 archivan en Charles River Laboratories.

Las células se transfirieron a la cámara de registro y se sobrefundieron con una solución de control del vehículo. La solución de pipeta para registros de células completas fue (composición en mM): aspartato de
25 potasio, 130; $MgCl_2$, 5; EGTA, 5; ATP, 4; HEPES, 10; pH ajustado a 7.2 con KOH. La solución de pipeta se preparó en lotes, alícuotas, se almacenó congelada y se descongelaron

alícuotas frescas cada día. Las pipetas de parche se fabricaron a partir de tubos capilares de vidrio utilizando un extractor de micropipetas P-97 (Sutter Instruments, Novato, CA). Se usó un amplificador de pinza de parche
5 comercial para registros de células completas. Antes de la digitalización, los registros actuales se filtraban con paso bajo a una quinta parte de la frecuencia de muestreo.

La inhibición de la corriente de hERG de inicio y estado estable se midió usando un patrón de pulso con
10 amplitudes fijas (prepulso de acondicionamiento: +20 mV durante 2 s; pulso de prueba: -50 mV durante 2 s) repetido a intervalos de 10 s, desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. La corriente de cola pico se midió durante el paso de 2 s a -50 mV.

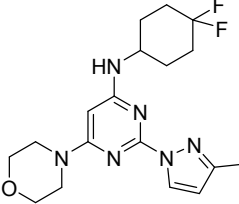
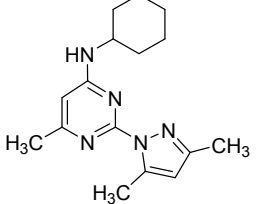
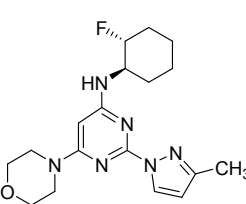
15 Se aplicó una concentración de artículo de prueba a cada célula ($n = 3$). La corriente pico se midió durante la rampa de prueba. Se mantuvo un estado estable durante al menos 30 segundos antes de aplicar el artículo de prueba o el control positivo. La corriente pico se midió hasta que
20 se alcanzó un nuevo estado estacionario. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

Los datos de biodisponibilidad oral se recogieron en ratas de la siguiente manera. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

- 25
- Cepa de rata/sexo: Sprague Dawley/Macho
 - Edad/peso corporal: 6 a 8 semanas/250-300gms
 - Numero de animales por grupo: $n = 3$

- Número total de grupos: 2 (1mpk IV y 10mpk PO)
- Ruta de administración: Oral (PO)/Intravenosa (IV)
- Volumen de dosificación: intravenoso (2 ml/kg)
- 5 y oral (10 ml/kg)
- Vehículos de formulación: formulaciones estándar o sugeridas por el patrocinador.
- Niveles de dosis (IV y Oral): 1mg/kg; intravenosa y 10 mg/kg; oral o como se sugiere
- 10 - Ayuno/Alimento: la dosificación oral se realizará con animales en ayunas durante la noche
- Frecuencia de dosificación: dosis única
- Puntos de tiempo para la extracción de sangre: (57 muestras de plasma para análisis)
- 15 - IV - 10 puntos (pre-dosis; 5 min; 15 min; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 24 h) [n = 3 ratas]
- PO - 9 puntos (pre-dosis; 15 min; 30 min; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 24 h) [n = 3 ratas]
- Recolección de muestras de sangre: cánula de
- 20 vena yugular.
- Anticoagulante: 0.2% de K2 EDTA
- Análisis de muestras por método bioanalítico de grado de descubrimiento desarrollado para la estimación del compuesto de prueba en plasma utilizando sistemas LC-MS/MS.

CUADRO 2

				
		Compuesto 1	Comparador A	Comparador B
Potencia de SK2 (SC₁₀₀)^a		400 nM	1380 nM	5800 nM
Fracción libre de cerebro^a		6.1%	1.2%	NA
Solubilidad cinética (mg/mL)		0.074	0.017	NA
Estabilidad de microsoma hepático[†]	Ratón	47%	1%	NA
	Rata	60%	1%	NA
	Perro	54%	2%	NA
	Mono	46%	1%	NA
	Humano	84%	50%	NA
Inhibición de Cyp1A2 (IC₅₀)		> 10 uM	640 nM	NA
Inhibición de Cyp3A4 (IC₅₀)		> 10 uM	> 10 uM	NA
Inhibición de Cyp2D6 (IC₅₀)		> 10 uM	790 nM	NA
Inhibición de hERG (IC₅₀)		> 10 uM	> 10 uM	NA
Biodisponibilidad Oral[§]		81%	5%	NA

SC₁₀₀ = Concentración que produce la duplicación de la corriente del canal.

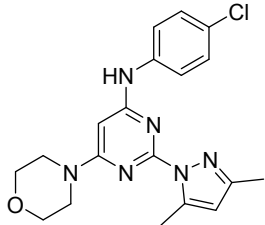
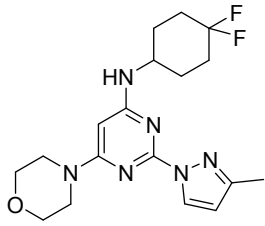
^aPequeña discrepancia en número en comparación con el cuadro anterior debido a diferencias insignificantes en los promedios tomados de experimentos posteriores.

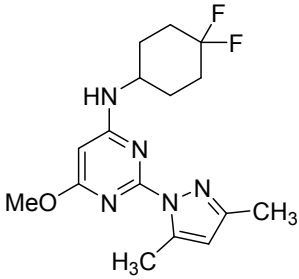
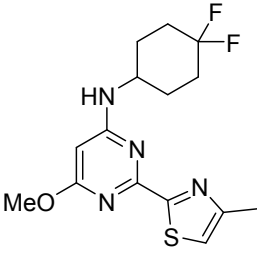
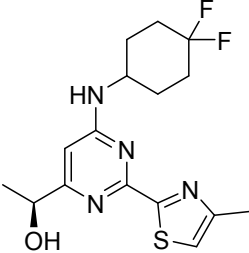
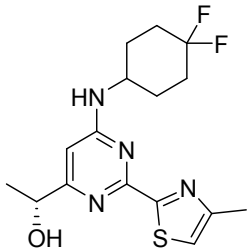
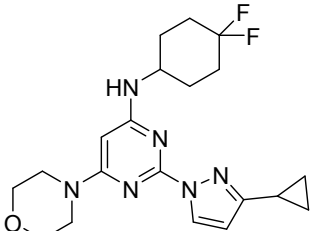
[†] % restante en 1 hora

[§] 10 mg/kg PO, 0.5 mg/kg IV en rata.

Como se muestra en los datos del cuadro 2 anterior, el Compuesto 1 es alrededor de 3 veces más potente en SK2 que el Comparador A y alrededor de 14 veces más potente en SK2 que el Comparador B. El Compuesto 1 también tiene mejor solubilidad, mayor BFF, estabilidad microsomal más alta, y mayor biodisponibilidad oral que el Comparador A. Una mejora general de BFF y la solubilidad sobre el Comparador A y el Comparador C derivado de fenilo también se demostró en todos los compuestos descritos aquí como se muestra en el cuadro 3. El Compuesto 1 se reproduce desde arriba para fácil comparación.

CUADRO 3

		Fracción libre de cerebro	Solubilidad cinética (mg/mL)
15	 Comparador C	0.16%	0.001
20	 Compuesto 1	6.1%	0.074

5	 Compuesto 2	2.76%	0.031
10	 Compuesto 3	2.69%	0.0709
15	 Compuesto 5	4.20%	0.0803
20	 Compuesto 6	4.31%	0.0667
	 Compuesto 7	1.55%	0.0497

Si bien hemos descrito varias modalidades de esta invención, es evidente que nuestros ejemplos básicos pueden alterarse para proporcionar otras modalidades que utilizan los compuestos y métodos de esta invención. Por lo tanto, 5 se apreciará que el alcance de esta invención debe definirse por las reivindicaciones adjuntas en lugar de por las modalidades específicas que se han representado a modo de ejemplo.

El contenido de todas las referencias (que 10 incluyen las referencias bibliográficas, las patentes emitidas, las solicitudes de patentes publicadas y las solicitudes de patentes co-pendientes) citadas a lo largo de esta solicitud se incorporan aquí expresamente en su totalidad por referencia. A menos que se defina lo 15 contrario, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el significado comúnmente conocido para alguien con experiencia ordinaria en la técnica.